

USO DE ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ENDOFÍTICAS NA PRODUÇÃO DE MILHO E CANA-DE-AÇÚCAR

ROBERTO BATISTA MARQUES JÚNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2010

USO DE ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS
ENDOFÍTICAS NA PRODUÇÃO DE MILHO E CANA-DE-AÇÚCAR

ROBERTO BATISTA MARQUES JÚNIOR

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

Co-orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 059/2010

Marques Júnior, Roberto Batista

Uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na produção de milho e cana-de-açúcar / Roberto Batista Marques Júnior. – 2010.
93 f. : il.

Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas
Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.
Bibliografia: f. 64 – 93.

1. Insumo biológico 2. Substâncias húmicas 3. Bactérias diazotróficas 4. Milho 5. Cana-de-açúcar I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 631.417

USO DE ÁCIDOS HÚMICOS E BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA PRODUÇÃO DE MILHO E CANA-DE-AÇÚCAR

ROBERTO BATISTA MARQUES JÚNIOR

Tese apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor em Produção Vegetal.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2010.

Comissão Examinadora:



Pesq. Jader Galba Busato – (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF



Prof.^a Lillian Estrela Borges Baldotto – (D.Sc., Genética e Melhoramento de
Plantas) - UFV



Prof. Marihus Altoé Baldotto - (D.Sc., Produção Vegetal) - UFV



Prof. Raul de Castro Carriello Rosa – (D.Sc., Produção Vegetal) - UESB



Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (Ph.D., Ciência do Solo) - UENF

Orientador

À minha família, pelo amor, educação e incentivo...

Aos meus orientadores, pela dedicação, estímulo e formação científica...

À minha esposa, Marcella Castelo Dutra Marques, pelo amor e carinho,
dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu grande amor;

Aos meus pais, Roberto Batista Marques e Noemi Lárrúbia Marques, pelo apoio e incentivo, e às minhas irmãs Fernanda Larrúbia Marques e Paula Larrúbia Marques, pelo companheirismo e momentos de descontração;

À minha segunda família, meu sogro, Carlos Roberto P. Dutra, minha sogra, Dayse Lúcida O. Castelo Dutra e Paulinho, meu cunhado, pelo carinho, apoio e incentivo;

Aos meus orientadores (Luciano Pasqualoto Canellas e Fábio Lopes Olivares), pela orientação competente, segura, objetiva, criteriosas e valiosas críticas profissionais e pessoais. Muito Obrigado!

Ao CNPq pela bolsa de estudos e suporte financeiro do projeto;

Ao professor Cláudio Roberto Marciano, pela disponibilidade e atenção;

Ao técnico agrícola da UFRRJ - Campus Leonel Miranda, Luís Francisco P. Manhães, pelas sugestões, auxílio e disponibilidade.

Aos proprietários e funcionários da Fazenda Abadias, Fazenda dos Coqueiros e Fazenda Ilha da Saudade;

Aos amigos que colaboraram diretamente nos ensaios, Daniel Zandonadi, Leonardo Dobbss, Raul, Rafael e Erineudo Canuto.

Ao corpo técnico da UENF. Obrigado Adrianinha!

Ao amigo Fábio Afonso M. M. de Assis Figueiredo, pela amizade e momentos de descontração.

Ao amigo Gustavo Jogaib, disponível e presente nos momentos decisivos.

Às funcionárias do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da UENF, Luciana Tavares Nogueira, Patrícia Laurindo e Maria de Fátima dos Santos Sampaio, pela boa vontade e informações prestadas.

Aos amigos da reunião de célula de casais, Tiago e Micheli Rangel, Cristiano e Gisele Sampaio, Mário dos Santos e Ivana Ribeiro, Fábio e Cleyde Soares, Carlos Renato e Carla Dantas, Franc Land e Janice Cabral, Eduardo e Leidiane Souza, Plínio E. Soares e Mariana Rodrigues, pela amizade, incentivo e apoio na reta final.

Ao amigo Pr. Marcos Lopes Fernandes, pela amizade, disponibilidade e apoio em momentos difíceis durante esta longa trajetória. Muito Obrigado!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu me mantivesse firme junto aos objetivos nobres da ciência.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. As substâncias húmicas: efeitos sobre solo, crescimento radicular e possíveis mecanismos de ação.	4
2.2. Bactérias diazotróficas endofíticas	6
2.2.1. Fixação Biológica do Nitrogênio - FBN	10
2.2.2. Bactérias diazotróficas endofíticas: além do benefício da FBN	11
2.3. A cultura da cana-de-açúcar: características botânicas, aspectos econômicos e panorama atual	14
2.3.1. Bactérias endofíticas em cana-de-açúcar	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Obtenção dos ácidos húmicos	17
3.2. Obtenção do inóculo bacteriano	18
3.3. Contagem de bactérias	18
3.4. Atributos tecnológicos e produtividade	18
3.5. Potencial do uso de AH com bactérias endofíticas como insumo agrícola: um estudo relacionado à fenologia do milho.	24
3.6. Efeito da aplicação de AH e bactérias diazotróficas com adubação nitrogenada sobre a produtividade do milho	25

3.7. Efeito da aplicação foliar de AH e bactérias endofíticas sobre a produtividade de cana-de-açúcar.	26
3.8. Potencial do uso de AH e bactérias diazotróficas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.	28
3.8.1. Aplicação de AH e bactérias em mudas micropropagadas <i>in vitro</i>	28
3.8.2 Preparo do Inóculo Misto e do acondicionamento das mudas	28
3.8.3. Ensaio de campo: avaliação do crescimento, produtividade e características agroindustriais	29
3.8.4.1 Localização e características climáticas	30
3.8.4.2 Colheitas e características avaliadas	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Potencial do uso de AH com bactérias endofíticas como insumo agrícola: um estudo relacionado à fenologia do milho.	34
4.2. Efeito da aplicação de AH e bactérias diazotróficas com adubação nitrogenada sobre a produtividade do milho	42
4.3. Efeito da aplicação foliar de AH e bactérias endofíticas sobre a produtividade de cana-de-açúcar.	45
4.4. Potencial do uso de AH e bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.	48
4.4.1 Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.	49
4.4.2. Resultados da Cana Planta	51
4.4.2.1 Teores foliares de N, P, K, Ca e Mg na cana-planta	51
4.4.2.2 Características agroindustriais da cana-planta	53
4.4.3. Resultados da primeira cana-soca.	54
4.4.3.1. Teores foliares de N, P, K, Ca e Mg na primeira cana-soca.	54
4.4.3.2 Características agroindustriais da primeira cana-soca	56
4.4.4 Resultados da segunda cana soca	57
4.4.4.1 Teores foliares de N, P, K, Ca e Mg na segunda cana-soca.	57
4.4.4.2. Características agroindustriais da segunda cana-soca	59
4.4.5. Produtividade agrícola da cana-de-açúcar	59
5. RESUMO E CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise elementar dos ácidos húmicos utilizados nos experimentos de avaliação do seu uso combinado com bactérias diazotróficas endofíticas.	17
Tabela 2. Microrganismos endofíticos e partes da planta de cana-de-açúcar de obtenção das estirpes	29
Tabela 3. Teores foliares de nutrientes considerados adequados para a cultura do milho.	35
Tabela 4. Teores médios de macronutrientes e micronutrientes na folha de milho DKB 789 em função dos tratamentos	36
Tabela 5. Teores médios de cálcio e cobre na folha de milho DKB 789 em função das épocas de aplicação.....	38
Tabela 6. Efeito da aplicação foliar de ácidos húmicos e bactérias endofíticas e da combinação de AH+bactérias sobre a produtividade de milho DKB789 em diferentes estádios fenológicos.....	39
Tabela 7. Produtividade agrícola do milho var DKB 789 em plantio direto, tratados com ácidos húmicos, bactérias diazotróficas endofíticas e adubação nitrogenada.	43
Tabela 8. Teores médios de macronutrientes nas folhas da cana-de-açúcar var RB 867515 (cana planta).	45

Tabela 9. Características agroindustriais da cana-de-açúcar RB 867515 (cana planta).....	45
Tabela 10. Efeito da aplicação foliar de bactérias diazotróficas endofíticas (HRC 54), ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (20 mg CAH L ⁻¹) e da aplicação de bactérias + ácidos húmicos sobre a produtividade de cana-de-açúcar var. RB867515 em condições de campo.	46
Tabela 11. População de bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar aos 7 dias após a inoculação.....	49
Tabela 12. População de bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar aos 60 dias após a inoculação.....	50
Tabela 13. Faixas de teores adequados (faixa de suficiência) de macro e micronutrientes para a cana-de-açúcar.....	51
Tabela 14. Teores médios de nutrientes nas folhas da cana-de-açúcar micropropagada var NA 5679 (cana planta).....	51
Tabela 15. Teor médio de cálcio na folha de cana-de-açúcar em função dos tratamentos na cana planta.....	52
Tabela 16. Características agroindustriais da cana-de-açúcar micropropagada NA 5679 aos 16 meses após plantio (cana planta).....	53
Tabela 17. Teores médios de nutrientes nas folhas da cana-de-açúcar micropropagada var NA 5679 (1ª soca).....	54
Tabela 18. Teor médio de P, K e Ca na folha de cana-de-açúcar em função dos tratamentos na primeira soca.....	55
Tabela 19. Características agroindustriais da cana-de-açúcar micropropagada NA 5679 aos 28 meses após plantio (1ª soca)	56
Tabela 20. Efeito dos tratamentos com AH e bactérias diazotróficas sobre a FIBRA e POL de colmos de cana-de-açúcar no segundo corte.	57

Tabela 21. Teores médios de nutrientes nas folhas da cana-de-açúcar micropropagada var NA 5679 (2ª soca).....	58
Tabela 22. Características agroindustriais da cana-de-açúcar micropropagada NA 5679 aos 40 meses após plantio (2ª soca)	59
Tabela 23. Produtividade agrícola da cana-de-açúcar (TCH) micropropagada var. NA 56 79 tratadas com três doses de vermicomposto (0, 10 e 20 Mg ha ⁻¹) e aplicação <i>in vitro</i> de ácidos húmicos (20 mg C L ⁻¹), bactérias diazotróficas e bactérias + ácidos húmicos.....	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Visão geral do experimento: A) Primeira aplicação, plantas com 4 folhas abertas e B) Segunda aplicação.....24
- Figura 2 Visão parcial do experimento com cana-de-açúcar RB 867515 (A) e aplicação de ácidos húmicos e bactérias aos 90 dias após o plantio (B).27
- Figura 3. Visão parcial do ensaio de campo: pesagem do vermicomposto (A), distribuição do vermicomposto nas linhas de plantio (B), plantio no campo (C).30
- Figura 4. Chuva acumulada x número de dias com chuvas para os anos 2005 (a), 2006 (b), 2007 (c) e 2008 (d) em Campos dos Goytacazes, RJ. Fonte: Estação meteorológica da UFRRJ, Campus Leonel Miranda.....32
- Figura 5. Log do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de raiz fresca em resposta à pulverização foliar em diferentes estádios fenológicos de milho DKB 789, crescidas em meio JNFb.34
- Figura 6. Efeito visual da aplicação foliar de ácidos húmicos (20mgCL^{-1}) e bactérias diazotróficas endofíticas (HIII206) no milho DKB 789. Controle à direita e AH + bactérias + N à esquerda.42
- Figura 7. Visão geral do experimento. Cana-de-açúcar micropropagada in vitro, na fase de aclimatização em casa de vegetação e no campo.....48

RESUMO

MARQUES Jr, Roberto Batista. Eng. Agrônomo, D.Sc.. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2010. Uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na produção de milho e cana-de-açúcar. Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas. Co-orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

Um dos maiores desafios hoje é o de buscar alternativas para a produção agrícola sustentada, sem comprometer as possibilidades de atendê-las no futuro. Este trabalho justifica-se pela necessidade de desenvolver insumos biológicos capazes de otimizar os sistemas agrícolas em bases sustentadas. A hipótese deste trabalho propõe que é possível combinar o efeito de promoção do crescimento radicular característico das substâncias húmicas (SH) com a inoculação de estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas endofíticas com vias a obtenção de respostas superiores à aplicação isolada de ambos. Para atender o objetivo geral de avaliar o potencial do uso de SH e bactérias diazotróficas endofíticas como insumo agrícola, foram instalados experimentos com milho e cana-de-açúcar em condições de campo. Os tratamentos utilizados foram basicamente quatro: 1) controle, 2) bactéria, 3) ácidos húmicos (AH); e 4) bactéria com AH, variando-se a estirpe bacteriana e a forma de aplicação de acordo com a cultura. A aplicação foliar de AH+bactérias+nitrogênio (50Kg de N ha^{-1}) no milho DKB 789 proporcionou um incremento de produtividade de 44,20% em relação ao controle nitrogenado e 82,35% em relação ao controle absoluto. Em outro experimento avaliou-se 3 épocas de aplicação foliar (4 folhas, 4+8 folhas, e 8 folhas) dos

tratamentos no milho. O uso de AH+bactérias proporcionou estímulos que variaram de 64 a 88% em relação ao controle, até o segundo estágio de desenvolvimento, prolongando o período de definição produtiva. Utilizando-se a aplicação foliar dos tratamentos na cana-de-açúcar var RB867515, observou-se incrementos de até 23% na produtividade. A aplicação de AH+bactérias in vitro na cana-de-açúcar micropropagada var NA 5679 aumentou a produtividade cerca de 53% de cana planta, com efeito residual na 1ª cana-soca quando aliada à adubação com vermicomposto (10Mg ha⁻¹). Após o segundo corte, constatou-se a necessidade de reaplicação dos tratamentos. A capacidade do AH de promover o crescimento vegetal, através do maior enraizamento, e, conseqüentemente, favorecer a infecção e a colonização, aliado à Fixação Biológica do Nitrogênio atmosférico e a capacidade de promover o crescimento vegetal das bactérias, é uma base que fundamenta o desenvolvimento de um bioestimulante vegetal para produção agrícola.

Palavras-chave: insumo biológico, substâncias húmicas, bactérias diazotróficas

ABSTRACT

MARQUES Jr, Roberto Batista. Agronomy Engineer, D.Sc.. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2010. Use of humic acids and endophytic diazotrophic bacteria in production of corn and sugarcane. Supervisor: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas. Co-supervisor: Prof. Fábio Lopes Olivares.

No Nowadays, one of the great challenges is to find alternatives for sustainable agricultural production, without compromising the possibility of meeting them in the future. This work is justified by the need to develop biological inputs to optimize the agricultural systems in a sustainable basis. The hypothesis of this work is the possibility to ally the effect of promotion of the growth root by the humic substances (HS) with the inoculation of selected strain of bacteria diazotrophic intending to obtain better results than using HS or bacteria idependently. To achieve the general goal of evaluating the potential of using HS and bacteria as an agricultural input, trials were conducted with corn and sugar cane in the field. Four treatments were used: 1) control, 2) bacterium, 3) humic acids (HA) and 4) bacterium with HA. The bacteria strain and the way of application varied depending upon the plant. The results of the leaf application of AH + bacteria + nitrogen (50kg N ha^{-1}) in corn DKB 789 provided an increase in productivity of 44.20% compared to control nitrogen and 82.35% compared to absolute control. In another experiment, were evaluated leaf applications on three times (4 leaves, 4+8 leaves, 8 leaves) of the treatments in corn. The use of AH + bacteria provided increase that ranged 64-88% over the control until the second stage of development, extending the period of productive setting. For the sugarcane var

RB867515 was observed increments near to 23% in the productivity, through the leaf application. The application of AH + bacteria in vitro in the cane sugar micropropagated var NA 5679 has increased productivity 53% cane plant, the residual effect on the second cut when combined with fertilization with vermicompost (10Mg ha^{-1}). After the 2rd cut, the requirement of new application was verified. The ability of HA to promote plant growth through increased rooting, and therefore promote infection and colonization, coupled with Biological Nitrogen Fixation and the ability of bacteria to promote plant growth has been demonstrating to serve as base of a biological input since improves rootings and development, resulting in high yield.

Word-key: biological input, humic substances, diazotrophs bacteria

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios hoje é o de buscar alternativas para a produção agrícola sustentável, ecologicamente correta e economicamente viável. A maioria dos processos ecológicos que ocorre na agricultura é influenciada, dentre outros fatores, pela matéria orgânica do solo, biodiversidade e sinergismo entre os componentes do agroecossistema (Altieri, 2002). A ciclagem dos nutrientes e a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) são a base do manejo da adubação nas lavouras agroecológicas.

A maior parte da matéria orgânica do solo nos ambientes tropicais é constituída pelas substâncias húmicas (SH) (Cunha, 2005) que modificam e condicionam as propriedades do solo (Santos e Camargo, 1999). Através da união de partículas sólidas, são capazes de atuar na estrutura do solo alterando a sua porosidade e densidade. Desse modo, contribuem para o aumento de armazenamento de água no solo. Também ajudam a manter o equilíbrio da solução pelo efeito tampão e a proporcionar menor perda de matéria orgânica com água de percolação, devido à insolubilidade das SH em água (Rocha e Rosa, 2003). Além disso, podem influenciar diretamente o desenvolvimento e o crescimento das plantas (Vaughan e Malcolm, 1985; Chen e Aviad, 1990; Nardi et al.; 2002; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Canellas et al., 2005; Zandonadi, 2006).

Bactérias diazotróficas em associação com algumas plantas apresentam importante contribuição na nutrição nitrogenada das mesmas. Estudos têm mostrado contribuições na ordem de 70% do nitrogênio necessário ao desenvolvimento da cana-de-açúcar (Urquiaga, 1992). Pequenos incrementos na

capacidade de realizar FBN correspondem a aumentos enormes da quantidade de N fixada no agrossistema (Olivares et al., 1997). Além disso, bactérias consideradas promotoras de crescimento de plantas (PGPR) podem atuar de forma direta através de fitormônios e solubilização de nutrientes, dentre outras, e indireta como antagonismo a organismos maléficos e redução de estresses (Ahmad et al., 2008).

Embora as pesquisas envolvendo bactérias endofíticas estejam crescendo nos últimos anos no Brasil, muito pouco se conhece sobre o efeito da utilização de bactérias diazotróficas endofíticas junto com as SH. Olivares et al. (2001) encontraram um padrão de alteração no sistema radicular de cana-de-açúcar e um estímulo na atividade hidrolítica das bombas de H^+ muito semelhante aos efeitos provocados pelos ácidos húmicos (Façanha et al., 2002). Tais efeitos poderiam alterar positivamente a magnitude e a longevidade das respostas de promoção de crescimento em plantas cultivadas. Ensaio realizado por Marques Jr (2006) demonstraram o potencial do uso combinado de ácidos húmicos (AH) com bactérias diazotróficas endofíticas na bioestimulação de plantas, em condições de laboratório e casa de vegetação. A investigação centrada no aprofundamento deste conhecimento serve de base científica de um novo processo tecnológico destinado à produção agrícola. Para verificar se estes efeitos benéficos, observados em laboratório, seriam estabelecidos em condições não controladas foram instalados experimentos de campo com duas culturas: milho, pelo ciclo curto e facilidade de cultivo e a cana-de-açúcar devido à sua importância socioeconômica da atividade sucroalcooleira.

A importância econômica do milho é caracterizada pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia. O uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo desse cereal, isto é, cerca de 70% no mundo (Embrapa, 2009). Já, a cana-de-açúcar além do potencial econômico pode contribuir para um desenvolvimento sustentável, baseado na busca da total manifestação do potencial ecológico e conservacionista desta cultura, através da solidariedade e responsabilidade para assegurar às gerações atuais e futuras, possibilidades para se desenvolverem. O sucesso da aplicação de AH e bactérias diazotróficas endofíticas em cana-de-açúcar, representa um potencial que colabora para

quebrar o paradigma atual de consumo energético baseado em fontes fósseis insustentáveis.

Este trabalho justifica-se pela necessidade de desenvolver tecnologia para atender a demanda por insumos biológicos para sistemas agrícolas sustentáveis.

A hipótese do presente trabalho é a de que é possível combinar o efeito de promoção do crescimento radicular característico das SH com a inoculação de estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas endofíticas com vistas a obtenção de respostas superiores à aplicação isolada de ambos, em condições de campo.

O objetivo geral desta obra foi avaliar o efeito da aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de milho e cana-de-açúcar.

Os ensaios que compõem este trabalho tiveram os objetivos específicos de avaliar:

- O efeito da aplicação foliar de AH isolados de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HIII 206 em diferentes épocas de aplicação na cultura do milho;
- A influência da aplicação foliar de AH isolados de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HIII 206 com adubação nitrogenada na produtividade do milho;
- A aplicação foliar de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 em cana-de-açúcar;
- O efeito da aplicação de AH isolados de vermicomposto e inóculo misto em cana-de-açúcar micropropagada na fase de aclimatização e em condições de campo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As substâncias húmicas: efeitos sobre solo, crescimento radicular e possíveis mecanismos de ação.

As substâncias húmicas (SH) constituem a maior parte da matéria orgânica do solo e, de acordo com a sua solubilidade, podem ser fracionadas em: ácidos fúlvicos (solúveis em meio ácido ou básico), ácidos húmicos (solúveis em meio alcalino e insolúveis em meio ácido) e huminas (fração insolúvel em meio alcalino e ácido) (Kononova, 1982; Stevenson, 1994; Guerra, 2008).

Os conceitos e definições de SH estão passando por revisões e novos modelos estão sendo sugeridos por diversos autores. As SH foram consideradas como agregados de compostos orgânicos transformados bioquimicamente que assumem diferentes formas que vão desde pseudomicelas (Wershaw, 1993) até a concepção de um arranjo supra-estrutural (Piccolo, 1997; Piccolo, 2002). De acordo com esse modelo, as SH consistem em agregados de unidades estruturais provenientes da transformação dos resíduos orgânicos, que estabilizados por meio de ligações hidrofóbicas fracas, formam um arranjo estrutural com massa molecular aparentemente elevada. No entanto, qualquer alteração no meio, tal como, variação de pH ou força iônica, pode desestabilizar essas ligações intra e intermoleculares promovendo rompimento dos supra-agregados e liberando pequenas unidades estruturais para o meio, que, por sua vez, podem interagir com plantas e microrganismos (Piccolo, 2002). Portanto, além de modificar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo através

da atividade dos seus grupamentos funcionais, as SH podem afetar diretamente a fisiologia das plantas.

No entanto, ainda não está bem claro como as SH podem modificar a bioquímica e o metabolismo das plantas. Alguns autores afirmam que o aumento na solubilidade do complexo húmico-metal facilita a absorção principalmente de micronutrientes Chen e Avid (1990), Chen et al. (2003), Pinton et al. (1999), Garcia-Mina (2005). Já, Visser (1984) sugere que o aumento na permeabilidade das membranas celulares provocadas pela notória ação surfactante que as SH apresentam. Assim, as membranas biológicas em contato com uma solução de SH teriam sua permeabilidade aumentada, conseqüentemente, a entrada de íons e a nutrição celular seriam facilitadas. Contudo, como a homeostase celular é prejudicada, seria pouco provável que a ação surfactante das SH teria algum significado fisiológico efetivo.

Sabe-se que as SH alteram o desenvolvimento das plantas (Chen & Avid, 1990; Façanha et al., 2002; Nardi et al., 2002; Zandonadi et al., 2007) e interferem indiretamente no metabolismo vegetal pelos efeitos ocasionados no solo, como complexação de metais, aumento da capacidade de troca catiônica, fornecimento de nutrientes e retenção de umidade (Rocha & Rosa, 2003). Esses efeitos das SH, principalmente da fração bioativa dos AH, sobre o desenvolvimento vegetal, têm-se demonstrado dependentes da fonte, da dose e do genótipo da planta (Vaughan & Malcolm, 1985; Rodda et al., 2006).

Os efeitos fisiológicos das SH mais estudados são sobre a promoção do crescimento radicular (Façanha et al., 2002; Rodda et al., 2006; Zandonadi et al., 2007). Grande parte dos efeitos bioestimulantes do AH tem sido creditada à sua atividade similar a auxinas (Chen & Avid, 1990; Canellas et al., 2002; Façanha et al., 2002). Zandonadi (2006), usando plantas mutantes insensíveis a auxinas, comprovou a ação hormonal do tipo auxínica promovida por SH isoladas de diferentes fontes de matéria orgânica. Canellas et al. (2002) detectaram a presença de auxinas em SH isoladas de vermicomposto e observaram aumento na atividade e na síntese da H⁺-ATPase da membrana plasmática isolada de raízes de milho. A síntese de H⁺-ATPase de membrana plasmática é induzida através da modulação de genes Mha2 (Frias et al., 1996). De acordo com Quaggiotti et al. (2004), as SH isoladas de vermicomposto também podem modular a expressão destes genes.

Substâncias húmicas de massa molecular relativamente elevada (essencialmente ácidos húmicos), promoveram o desenvolvimento radicular de plântulas de milho e café e a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (Façanha et al., 2002). As H⁺-ATPases (bombas de H⁺) são enzimas transmembranares capazes de hidrolizar ATP, gerando energia e um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido com absorção de macro e micronutrientes. Além disso, promove o aumento da plasticidade da parede celular através da acidificação do apoplasto, fator fundamental para o processo de crescimento e alongamento da célula vegetal (Cosgrove, 1998). Esse último mecanismo está relacionado com a *teoria do crescimento ácido*, que postula que o aumento de extrusão de prótons mediado pela H⁺-ATPase da membrana plasmática induz a ação de enzimas específicas que atuam sobre a parede celular, aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (Rayle e Cleland, 1972).

A aplicação de AH em plantas de interesse agrícola vem sendo estudada e confirmando seu uso em solução para a promoção de crescimento de diversas culturas, tais como, abacaxi (Baldotto et al., 2009), arroz (Tejada e Gonzáles, 2004) e videira (Ferrara e Brunetti, 2008). A cana-de-açúcar e milho testados em condições controladas (Marques Jr et al. 2008; Conceição et al., 2009), poderiam expressar um potencial agrônômico em condições de campo.

2.2. Bactérias diazotróficas endofíticas

Primeiramente, o termo endófito foi usado para se referir à colonização interna das raízes das plantas por microrganismos (bactérias e fungos) que usualmente não causam dano aparente ao hospedeiro e vivem a maior parte de sua vida dentro da planta. Posteriormente, esta definição foi extendida a bactérias e fungos que colonizam o interior das raízes e parte aérea e que promovem efeitos benéficos aos hospedeiros (Petrini et al., 1992).

A definição mais aceita do termo endófito, consiste de microrganismos que podem ser isolados de tecidos vegetais, superficialmente desinfestados, ou extraídos de dentro da planta, e que não causam danos visíveis ou induzem sintomas na planta (Kloepper et al., 1997).

Devido à capacidade de colonizar o interior dos tecidos vegetais (raízes e parte aérea) sem incitar sintomas visíveis de doença, os microrganismos endofíticos podem ser capazes de promover o crescimento vegetal (Mirza et al., 2001), atuando sobre a fisiologia do hospedeiro de uma forma positiva ou ainda, seguindo as tendências da biotecnologia moderna, emergir como vetores naturais sendo utilizados com o objetivo de transferir e principalmente expressar genes residentes ou exógenos, introduzidos pela técnica de DNA recombinante (Baldani et al., 1997).

Estes microrganismos parecem penetrar ativamente nos tecidos das plantas usando enzimas hidrolíticas como celulases e pectinases, além de usarem aberturas naturais ou provocadas por injúrias (Quadt-Hallmann et al., 1997; Reinhold-Hurek e Hurek, 1998). O modo de dispersão das bactérias endofíticas no ambiente pode ser via sementes, propagação vegetativa, partes mortas da planta ou insetos (Baldani et al., 1997).

Bactérias endofíticas possuem a capacidade de colonizar habitats específicos no interior dos tecidos das plantas, o que permite que estas bactérias estejam protegidas dos níveis de oxigênio que inibem a atividade da enzima nitrogenase. Além disso, facilitam o acesso, com reduzida competição, por fontes de carbono. Desta forma, estas bactérias são beneficiadas e podem contribuir com a FBN diretamente nos tecidos das plantas. Esta colonização pode ser local, como nos espaços intercelulares das células do córtex radicular ou pode ser sistêmica, sendo transportada através dos elementos condutores (James et al., 1994).

Azospirillum

Bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum* apresentam atualmente oito espécies, sendo sete consideradas diazotróficas e com capacidade de colonizar tanto a rizosfera quanto o interior de raízes de várias plantas forrageiras e cereais: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978), *A. amazonense* (Magalhães et al., 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold et al., 1987), *A. irakense* (Khammas et al., 1989), *A. largimobile* (Dekhil et al., 1997), *A. dobereineriae* (Eckert et al., 2001) e *A. oryzae* (Xie e Yokota, 2005).

Descrito por Tarrand et al. (1978), a espécie mais importante deste gênero é *A. brasilense*, por acumular maior número de informações sobre aspectos fisiológicos e moleculares. As espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* são freqüentemente encontradas colonizando a maioria das plantas de regiões tropicais e temperadas de interesse agrônômico (Baldani et al., 1984; Baldani et al., 1997). As espécies citadas e o *Azospirillum amazonense* têm sido isolados em milho, arroz, cana-de-açúcar, sorgo, palmeiras e fruteiras (Reis, 2006). Na cana-de-açúcar tanto o *A. brasilense* quanto o *A. lipoferum* são encontrados em raízes, colmos e folhas, enquanto *Azospirillum amazonense* é encontrado em raízes e colmos (Reis et al., 2000).

As demais espécies são de ocorrência mais restrita. *A. halopraeferens*, foi isolada somente do rizoplano e raízes da *Poaceae Kallar*, crescida em solos salinos no Paquistão (Reinhold et al., 1987). *A. irakense* só foi encontrada em amostras da rizosfera e raízes de plantas de arroz cultivadas no Iraque (Khammas et al., 1989). *A. largomobile* tem sua ocorrência restrita às águas de um lago na Austrália (Dekhil et al., 1997) e não está descrita como fixadora de nitrogênio. A partir de plantas *Miscanthus sinesensis*, família *Poaceae*, foi isolada uma nova bactéria nomeada *A. doebereineriae* (Eckert et al., 2001). *A. oryzae* foi isolada de raízes de arroz em 1982, no Japão (Xie e Yokota, 2005).

Herbaspirillum

A primeira espécie descrita foi *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986) isolada da rizosfera, rizoplano e raízes desinfestadas de arroz, milho, sorgo e também isolada de raízes, folhas e colmos de cana-de-açúcar cultivada no Brasil (Baldani et al., 1996) e na Austrália (Boddey et al., 1998), dendezeiro e pupunheira (Ferreira et al., 1995), bananeira (Cruz et al., 2001), capim-elefante (Reis et al., 2000) e arroz inundado (Rodrigues, 2004; Brasil, 2005).

H. rubrisubalbicans (Gillis et al., 1991; Baldani et al., 1996) tem sido encontrada em associação com cana-de-açúcar, em raízes de *Digitaria insularis* crescida no interior dos canaviais (Olivares et al., 1996), em capim-elefante (Reis et al., 2000) e em frutíferas como abacaxizeiros e bananeiras (Cruz et al., 2001).

H. frisingense foi descrita a partir do isolamento de amostras de tecidos de raízes e colmos de diversos genótipos de capim-elefante coletados no Brasil, e

das poaceas *Spartina pectinata*, *Miscanthus sinensis* e *M. sacchariflorus*, coletadas na Alemanha (Kirchhof et al., 2001).

A mais nova espécie diazotrófica descrita, a *H. lusitanum*, não fixa nitrogênio em associação com não leguminosas. Foi isolada de nódulos de raízes de feijão coletados em Portugal (Valverde et al., 2003).

Gluconacetobacter

Bactérias endofíticas deste gênero fixadoras de nitrogênio atmosférico são: *G. Azotocaptans*, *G. Johanna*e e *G. diazotrophicus*.

As espécies *G. azotocaptans* e *G. johanna*e foram isoladas de rizosfera e rizopiano de plantas de café cultivadas no México (Fuentes-Ramírez et al., 2001) e amostras de rizosfera de café cultivados no Brasil (Santos et al., 2006).

Gluconacetobacter diazotrophicus possui poucos hospedeiros, foi encontrada em associação com plantas ricas em açúcar como a cana-de-açúcar, batata-doce e capim cameron, todas apresentando propagação vegetativa (Döbereiner, 1992). Esta bactéria foi isolada de inúmeras variedades de cana-de-açúcar crescidas nas diversas regiões do Brasil, tendo sido encontrada também na Austrália (Li e Macrae, 1991), Cuba (Fuentes-Ramirez et al., 1993), Argentina (Dong et al., 1994) e México (Bellone et al., 1997). Esta bactéria coloniza raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar em números de até 10^6 células g^{-1} de massa fresca (Reis et al., 1994; Boddey et al., 1998).

Burkholderia

Bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Burkholderia* foram isoladas de arroz (Oliveira, 1992), mandioca (Balota, 1994), batata-doce e posteriormente de cana-de-açúcar (Baldani et al., 1996). São encontradas em associação com plantas da família das leguminosas, participando na formação de nódulos. As espécies *B. tuberum* e *B. phymatum* (Vandamme et al., 2002), foram isoladas de *Aspalathus carnosa*, na África do Sul e *Machaerium lunatum*, na Guiana Francesa. Entretanto, existem diferenças entre as bactérias que nodulam plantas leguminosas, daquelas que se associam às não leguminosas (Vandamme et al., 2002).

Diversas espécies foram descobertas em cana-de-açúcar: a *B. unamae* foi isolada de cana-de-açúcar, café e milho de diferentes localidades do México (Caballero-Mellado et al., 2004), *B. tropica* isolada de plantas de cana-de-açúcar no Brasil e África do Sul, solo nos EUA e milho (Reis et al., 2004) e *B. silvatlantica* sp, isolada de folhas de cana-de-açúcar e rizosfera de milho no Brasil (Perin et al., 2006). De amostras de cana-de-açúcar brasileiras e australianas foram obtidos vários isolados das espécies *B. tropica*, *B. kururiensis* e *B. caribensis* (Boddey, 2002).

2.2.1. Fixação Biológica do Nitrogênio - FBN

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais abundantes nas plantas como constituinte essencial de proteínas, hormônios e clorofilas, entre outras moléculas. Embora presente na atmosfera em aproximadamente 78% da constituição gasosa, o N é encontrado na forma molecular (N₂), que não é absorvível pelas plantas. A maioria obtém o N do solo sob as formas de nitrato, amônia, amônio e aminoácidos, sendo encontrados canais e transportadores de membranas para todas estas formas (Willians e Miller, 2001), que só estão prontamente disponíveis em pequenas quantidades no solo (1 a 2% do N do solo), necessitando ser transformado em formas combinadas, passíveis de serem aproveitadas pelas plantas.

As transformações industriais ocorrem com gastos energéticos elevados, sendo necessário cerca de 15 Mcal para obtenção de 1 kg de N-fertilizante a partir do N do ar (Macedo e Koller, 1997), que utiliza temperaturas em torno de 200 °C e pressões em torno de 200 atm, requerendo energia derivada de combustíveis fósseis (processo Haber-Bosch), energeticamente dispendiosos (Taiz e Zeiger, 2004). Estes combustíveis possuem reservas limitadas, e conseqüentemente preços crescentes.

Estima-se que a contribuição de nitrogênio fixado biologicamente seja de 139 milhões de Mg de N ano⁻¹, enquanto que a fixação química contribui com 49 milhões de Mg de N ano⁻¹, de modo que a substituição de fertilizantes químicos pela inoculação com bactérias que nodulam leguminosas do gênero *Bradyrhizobium*, nos campos de soja, representou uma economia de cerca de US\$ 3,3 bilhões para agricultura brasileira em 2006 (Moreira, 2008).

No processo de FBN, organismos procariotos são capazes de assimilar o N_2 atmosférico e convertê-lo a forma assimilável (NH_3). A FBN ocorre graças à enzima nitrogenase, o que do ponto de vista energético é dispendioso para o organismo que a realiza, sendo que a reação pode ocorrer à temperatura ambiente e pressão atmosférica adequada. (Reis et al., 2006).

Além da incorporação de nitrogênio no ecossistema, a FBN tem um papel fundamental na preservação do meio ambiente, principalmente pela redução dos níveis de nitrato lixiviado para lagos e rios advindos de fertilizantes nitrogenados. A FBN constitui um processo chave com elevado potencial de aplicação na agricultura comercial, e tem sido alvo de pesquisas desenvolvidas no Brasil e no mundo com vias a possibilitar redução de custos e de desequilíbrios do meio ambiente.

2.2.2. Bactérias diazotróficas endofíticas: além do benefício da FBN

Uma das primeiras associações tipicamente rizosféricas descobertas entre gramíneas e bactérias foi com *Beijerinckia fluminensis* e cana-de-açúcar em solos tropicais (Döbereiner & Ruschel, 1958). Posteriormente, a identificação do novo gênero de bactéria diazotrófica associada a raízes de gramíneas, *Azospirillum* (Döbereiner & Day, 1975), resultou em um novo incentivo para o estudo destas interações (Baldani et al, 1997).

Pesquisas envolvendo bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotróficas associadas às plantas têm mostrado a ocorrência de uma grande variedade de microrganismos isolados a partir das mais diversas famílias do reino vegetal. Estes microrganismos estão presentes nos mais diversos ecossistemas desde no solo, nas plantas, no mar, no interior de insetos e até nos animais (Baldani et al., 2002). As bactérias diazotróficas que colonizam plantas da família das gramíneas podem ser agrupadas em três categorias: organismos de rizosfera, que inclui todas as espécies que colonizam a superfície radicular, tais como: *Azotobacter paspali* e *Beijerinckia* spp.; endofíticos facultativos, todas as bactérias diazotróficas que podem colonizar a superfície e interior das raízes, representadas basicamente pelas espécies de *Azospirillum*, exceto *A. halopraeferens*; e endofíticos obrigatórios, constituído principalmente pelas espécies isoladas mais recentemente como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum* spp e *Azoarcus* spp, que são capazes de colonizar o interior de raízes e tecidos aéreos

de plantas (Baldani et al., 1997). As espécies mais estudadas pertencem ao gênero *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Estas têm sido também isoladas de outras plantas, como café, abacaxi, sorgo, dentre outras (Reis et al., 1993; Baldani et al., 1997; James & Olivares, 1998).

A variação na contribuição da FBN na nutrição nitrogenada em gramíneas foi demonstrada por uma série de trabalhos com diferentes metodologias que incluem a redução de acetileno (Burris, 1975), diferença do N-total (Boddey, 1987), diluição isotópica de ^{15}N (Vallis et al., 1967; Boddey et al., 1994) e abundância natural de ^{15}N (Shearer & Kohl, 1986). No entanto, os efeitos das bactérias diazotróficas sobre a planta hospedeira vão além da contribuição da FBN, como: promoção do crescimento e proteção vegetal, maior resistência a estresses bióticos e abióticos, além de apresentar alto potencial biotecnológico (Andrews e Harris, 2000; Zahir et al., 2003). Por isso, a prática da inoculação de bactérias que possuem tais efeitos em plantas não leguminosas foi adotada em alguns países e demonstram potencial para o agronegócio (Bashan, 1998; Kennedy et al., 2004).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) compõem um grupo heterogêneo de bactérias que podem ser encontradas na rizosfera e superfície da raiz, atuando no crescimento das plantas de forma direta e indireta (Ahmad et al., 2008). Estas bactérias apresentam a habilidade de converter nutrientes importantes da forma indisponível para a disponível. Esta conversão ocorre através de processos biológicos e sob a influência de fatores ambientais como, por exemplo, o tipo de solo (Vessey, 2003). Os mecanismos de ação direta das PGPR incluem, por exemplo, a fixação biológica de nitrogênio, síntese de sideróforo (Bar-Ness et al., 1992), produção de fitormônios (Bastián et al., 1998; Glick et al., 1999), solubilização de fósforo e zinco (Sundara et al., 2002; Saravanan et al., 2007), dentre outros. Já os mecanismos de ação indiretos incluem a supressão de organismos deletérios do ambiente endofítico através de competição ou antibiose (Nejad e Johnson, 2000, Somers, et al., 2005), redução de fatores de estresses como etileno endógeno (Enyedi et al., 1992), antagonismos a fitopatógenos (Tsimili-Michael et al., 2000; Piñón et al., 2002), dentre outros.

As raízes das plantas podem apresentar modificações no seu desenvolvimento em resposta a um estímulo ambiental, incluindo gravidade, luz,

contato e invasão por microrganismos (Baldani et al., 1999). Considerando seu possível papel no crescimento de pêlos radiculares, as bactérias diazotróficas poderiam promover efeitos benéficos sobre a morfologia radicular através de alguns possíveis mecanismos, tais como, indução da expressão de genes que são responsáveis pelo crescimento de pêlos, em função de mudanças nos níveis de fitormônios (Jain e Patriquin, 1985; Bashan e Levanony, 1990), mudanças na absorção de nutrientes minerais (Lin et al., 1983) ou ainda através da indução da extrusão de prótons (Bashan, 1990). Não se sabe até que ponto, a formação de pêlos radiculares depende de fatores genéticos, ambientais e, ou da produção de substâncias promotoras de crescimento, que também são produzidas pela maioria das bactérias diazotróficas endofíticas (Mirza et al., 2001; Radwan et al., 2002).

A promoção de crescimento vegetal por bactérias tem sido atribuída à produção de fitormônios que são capazes de promover o desenvolvimento e proliferação das raízes, resultando em uma absorção eficiente de água e nutrientes (Mirza et al., 2001). Zahir et al. (2001) demonstraram que espécies pertencentes aos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas* são capazes de produzir citocininas e que, em associação com plantas de arroz, podem aumentar o rendimento desta cultura. Benizri et al. (1998) mostraram que na associação de milho com a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, os compostos secretados pelas raízes na rizosfera podem estimular a produção de auxinas pela bactéria.

Uma série de trabalhos verificou aumento de massa e área radiculares de plantas não-leguminosas inoculadas com diazotróficos (Olivares, 1997; Canuto et al., 2000). Olivares et al. (2001) verificaram aumento na atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática isolada de raízes de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 e um aumento correspondente na área radicular, em um efeito bastante semelhante ao provocado pelas SH. Alguns autores demonstraram a produção de fitormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas, por *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* (Bastian et al., 1998; Fuentes-Ramírez et al., 1993). Hormônios produzidos pelas bactérias podem induzir a formação de raízes laterais, contribuindo para incrementos de biomassa e alterações na geometria radicular com conseqüências positivas para o crescimento, bem como facilitar a reinfestação dos microrganismos e aumento do nível populacional no interior dos tecidos.

2.3. A cultura da cana-de-açúcar: características botânicas, aspectos econômicos e panorama atual

Originária da Nova Guiné, a cana-de-açúcar pertence à divisão Angiospermae, classe Monocotyledoneae, membro da família Poaceae (anteriormente denominada Gramineae), tribo Andropogoneae e gênero *Saccharum*. Dentro deste gênero ocorrem principalmente seis espécies: *Saccharum officinarum* L, *S. robustum* Brandes e Jeswiet, *S. barberi* Jeswiet, *S. sinense* Roxb, *S.spontaneum* L., e *S. edule* Hassk. (Daniels & Roach ,1987).

Atualmente, o Brasil possui 4 programas de melhoramento da cana-de-açúcar principais: 1) Programa Cana do Instituto Agrônomo de Campinas, iniciado em 1933; 2) Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-açúcar da RIDESA (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro), formado por Universidades Federais (UFRPE, UFAL, UFGAL, UFGO, UFV, UFRRJ, UFSCar, UFPR); 3) Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), que iniciou seus trabalhos em 1968 (como COPERSUCAR); 4) CanaVialis (Grupo Votoratin), que iniciou suas atividades em março de 2003. Estudos paralelos ao desenvolvimento dessas variedades, relacionados à FBN por bactérias diazotróficas endofíticas em associação com estas plantas, têm sido realizados visando atender à crescente demanda pela produção de cana-de-açúcar.

No Brasil, a cultura proporciona a geração de cerca de 4 milhões de empregos diretos e indiretos, movimentando em torno de 41 bilhões de reais e recolhendo cerca de 12 bilhões de reais em impostos e taxas (Jornalcana, 2008). Ocupa cerca de 8,0 milhões de hectares cultivados (IBGE, 2009), representando uma extensa área territorial, compreendida entre os paralelos 35° de latitudes Norte e Sul, apresentando melhor rendimento em climas tropicais, com uma produção brasileira que supera a marca de 387 milhões de toneladas, volume processado em 306 usinas - das quais 236 no Centro-Sul - e que faz do país o maior produtor mundial. A cultura encontra condições climáticas favoráveis para se desenvolver no Brasil. Quase todos os estados brasileiros produzem cana, muito embora o maior estado produtor ainda seja São Paulo, com cerca de 60% da produção nacional.

O Brasil, graças à agroindústria canavieira, é pioneiro na utilização em larga escala de combustível limpo e renovável. É o principal país a empregar o álcool (etanol combustível) em veículos automotivos, após o desenvolvimento dos chamados “carro bicombustível ou FLEX”, movidos a álcool, a gasolina ou a ambos os combustíveis ao mesmo tempo.

2.3.1. Bactérias endofíticas em cana-de-açúcar

A pesquisa agrícola moderna tem como maiores desafios a extensão da FBN para culturas não-leguminosas. Aumentos relativamente pequenos no potencial de FBN de culturas estratégicas no combate à fome (*e.g.*, arroz, milho) ou em alternativas energéticas (cana-de-açúcar) teriam impacto econômico e ecológico muito significativo (Olivares, 1997). Do ponto de vista econômico, a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados reduz custos da produção, tornando a agricultura economicamente mais viável e competitiva, e, do ponto de vista ecológico, uma baixa aplicação de nitrogênio reduz problemas de poluição ambiental (Döbereiner, 1997).

A descoberta de endófitos associados com plantas de cana-de-açúcar (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Baldani et al., 1992; Olivares et al., 1997) tem encorajado muitos laboratórios a trabalhar na identificação de associações entre outras gramíneas e bactérias. O processo de infecção e colonização por essas bactérias foi estudado, em cana-de-açúcar, por James et al. (1994), que verificaram que a via de penetração ocorre pela lamela média no ponto de emergência da raiz lateral, ferimentos da epiderme ou pela coifa da raiz, bem como através dos estômatos foliares. Dentro das plantas, as bactérias são preferencialmente encontradas nos espaços intercelulares, paredes celulares e lúmen, dos elementos de vaso do xilema, sendo provavelmente, o apoplasto o local de maior atividade fisiológica (James e Olivares, 1998).

Com a descoberta dos diazotróficos endofíticos colonizando em números elevados raízes, colmo e folhas de cana-de-açúcar e de outras gramíneas, é possível explicar o grande potencial da contribuição de diazotróficos para o suprimento de nitrogênio às culturas de cana-de-açúcar, já que em certas variedades desta cultura, a fixação de nitrogênio por estas bactérias pode ser suficiente para suprir três vezes a produtividade média atual brasileira (60 Mg ha⁻¹

¹), desde que outros nutrientes e água não sejam limitantes (Franco e Dobereiner, 1994). Estudos para avaliar o potencial da fixação biológica de nitrogênio em variedades de cana-de-açúcar brasileiras crescidas no campo apontam para a importância das condições ambientais favoráveis (solo e clima) para os melhores efeitos da FBN (Polidoro et al. 2001, Boddey et al., 2003).

Respostas variadas de plantas à inoculação com bactérias diazotróficas têm sido associadas também ao veículo e à forma de inoculação destas bactérias. Diversas formas de inoculação têm sido utilizadas, porém poucos trabalhos têm sido realizados para aperfeiçoar o processo de inoculação. No entanto, métodos como imersão de sementes ou plântulas em cultura microbiana antes do plantio (Islam e Bora, 1998), adição da cultura bacteriana diretamente sobre o substrato (Canuto et al., 2003) ou aplicação foliar (Singh et al., 1999) têm sido utilizados com frequência. Outras metodologias de inoculação bastante estudadas têm sido as inoculações de bactérias diazotróficas em plântulas micropropagadas (Reis et al., 1999) e colmos (Muthukumarasamy et al., 1999) de cana-de-açúcar.

Estudos envolvendo metodologias de inoculação demonstraram que a *H. seropedicae* (HRC54) foi encontrada em maior número populacional em plantas de cana-de-açúcar, variedade RB72454 e oriundas de toletes, inoculadas por imersão durante 6 horas ou adição do inóculo no substrato (Canuto, 2008). Oliveira et al. (2002, 2006) avaliaram o efeito da inoculação de misturas bacterianas nas variedades de cana-de-açúcar SP701143 e SP813250 micropropagadas e verificaram que houve efeito da inoculação sobre a FBN, cuja contribuição média foi ao redor de 30 % do nitrogênio acumulado quando inoculadas com a mistura de cinco bactérias diferentes. A variedade RB72454 é consegue um bom desenvolvimento em condições de baixa fertilidade do solo, sendo uma das que se beneficiam do processo de FBN (Xavier, 2006).

Trabalhos realizados em condições controladas utilizando inoculação de bactérias como *Herbaspirillum* junto com substâncias húmicas em mini-toletes da variedade RB72454 de cana-de-açúcar tratados termicamente, mostraram efeito da inoculação, combinada ou não com substâncias húmicas, sobre o aumento populacional da bactéria inoculada, assim como na promoção do crescimento radicular induzido por ambos, inoculação da bactéria selecionada e do ácido húmico, sugerindo novos modelos de utilização das bactérias diazotróficas em plantas (Marques Jr et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Para atingir os objetivos propostos nesse trabalho, uma série de experimentos foi realizada com milho e cana-de-açúcar. As descrições dos procedimentos e metodologias se encontram a seguir:

3.1. Obtenção dos ácidos húmicos

Os ácidos húmicos foram extraídos e cedidos pelo Prof. PhD. Luciano Pasqualoto Canellas. Foram isolados de vermicomposto conforme Canellas et al (2002) para os experimentos com cana-de-açúcar micropropagada e segundo Canellas et al (2010) para os demais ensaios. A Tabela 1 apresenta a análise elementar dos AH cedidos para os experimentos.

Tabela 1. Análise elementar dos ácidos húmicos utilizados nos experimentos de avaliação do seu uso combinado com bactérias diazotróficas endofíticas.

Ácidos Húmicos	Composição Elementar				Razão Atômica		
	C	H	N	O	C/N	H/C	O/C
	g Kg^{-1}						
AH _V *	485,0	56,0	32,0	422,0	17,68	1,59	0,65
AH _V **	446,0	45,1	37,5	471,4	14,00	1,20	1,20

*Ácidos húmicos utilizados no experimento com cana-de-açúcar micropropagada

** Ácidos húmicos utilizados nos experimentos com milho e cana-de-açúcar oriundas de toletes

3.2. Obtenção do inóculo bacteriano

O inóculo foi obtido a partir de crescimento bacteriano em meio DYGS líquido (Döbereiner, 1995), à temperatura de 30°C, por 36 horas, sob 140 rpm.

3.3 Contagem de bactérias

O número de bactérias na raiz (expresso em log n^o de bactérias por g de massa fresca da raiz) foi estimado utilizando a técnica Número Mais Provável (NMP) (Pochon e Tardieux, 1962). Utilizou-se 1 grama de raiz lavada com água destilada, cortada em pedaços e macerada em 9 mL de solução salina (1/4 dos sais do meio NFb (Tarrand et al., 1978). Em seguida, 1 mL desta solução foi utilizado para a realização das diluições seriadas de 10⁻² a 10⁻⁹ em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina. Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi inoculada em frascos com capacidade para 12 mL, contendo 5 mL dos meios semi-sólidos e semi-seletivos para cada espécie inoculada: LGI-Pcaldo (Reis et al., 1994) para populações de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; JNFB (Baldani et al., 1992) para *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*; LGI (Baldani et al., 1984) para *Azospirillum. Amazonense*; JMV para *Burkholderia* sp. A contagem do número de microrganismos foi baseada na presença ou ausência de película característica pela consulta a Tabela de McCrady (Döbereiner et al., 1995) para 3 repetições por diluição e os valores obtidos sofreram transformação logarítmica. A análise estatística foi realizada através do software SAEG for Windows, versão 9.0, desenvolvido pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).

3.4 Atributos tecnológicos e produtividade

A qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima industrial pode ser definida por uma série de características intrínsecas da própria planta, alterada pelos manejos agrícola e industrial, que definem seu potencial para produção de açúcar e álcool. Sob os aspectos tecnológicos, os colmos são constituídos de caldo e de fibra (Fernandes, 2003).

Segundo Stupiello (1987), a qualidade da cana-de-açúcar depende de um grupo de atributos e não se deve apenas considerar como um sinônimo do

conteúdo de sacarose, ainda que seja o parâmetro mais importante. Alguns dos diversos atributos considerados para indicar a qualidade são: Pol da cana, Pol do caldo, brix do caldo, açúcares redutores, pureza aparente e fibra da cana.

Teor de Sólidos Solúveis (°Brix em %)

Brix, segundo Fernandes (2003), é o parâmetro mais utilizado na indústria do açúcar e do álcool. Sólidos solúveis Totais (°Brix em %) é a porcentagem, em gramas, de sólidos dissolvidos na água presente em um produto (cana-de-açúcar). Expressa a porcentagem aparente de sólidos solúveis contidos em uma solução açucarada impura.

A determinação do Brix é feita a partir do caldo extraído da cana-de-açúcar efetuada em refratômetro digital, provido de correção automática de temperatura e ajuste de campo, com saída para impressora e/ou registro magnético, devendo o valor final ser expresso a 20°C. O índice de refração que é proporcional ao índice de sólidos solúveis ou Brix é obtido pela expressão:

$$I_r = \frac{\text{Sen}(i)}{\text{Sen}(r)}$$

Em que:

I_r – Brix ou teor de sólidos solúveis;

Sen (i) – Seno do ângulo de incidência

Sen (r) – Seno do ângulo de refração.

Para o julgamento do estágio de maturação da cana com relação ao brix, o valor ideal para considerá-la madura é de no mínimo 18,0% e durante todo o decorrer da safra (Fernandes, 1985).

Fibra industrial na cana-de-açúcar (%)

Fibra é a porção do colmo da cana-de-açúcar insolúvel em água, incluindo toda a matéria estranha que acompanha os colmos (Lopes, 1986; Gravois e Milligan, 1992).

A fibra industrial será função do peso, em gramas, do material fibroso residual de prensagem (bolo úmido de bagaço) e equivalerá a 0,1005 desse peso, expresso em porcentagem. Portanto, o cálculo da fibra da cana é baseado na correlação entre resíduos fibrosos e fibra industrial, determinada experimentalmente (CRSPCTS-PB, 1997) segundo a equação abaixo:

$$FIBRA = \frac{(100.PS)(PU.b)}{5.(100 - b)}$$

Em que:

PS = peso do bolo seco a 105°C;

PU = peso do bolo úmido (resíduo fibroso);

b = Brix do caldo extraído

A quantidade de fibra na cana-de-açúcar tem influência direta no processo de moagem, pois se tem que uma porcentagem de fibra muito alta significa uma baixa quantidade de caldo extraído e conseqüentemente, baixa produção de açúcar. Por outro lado, como a fibra é utilizada para a produção de energia na queima das caldeiras, uma porcentagem muito baixa requer um custo de energia mais elevado no processo (Gravois e Milligan, 1992).

Teor de Sacarose (Pol do caldo em %)

De acordo com Lopes (1986), Pol é a quantidade em peso de sacarose em 100 ml de solução, medida pelo desvio ótico provocado pela solução, no plano de uma luz polarizada. O índice Pol da cana sofre influência do teor de fibra da cana (Stupiello, 1987).

A determinação do teor de sacarose é realizada após a clarificação do caldo com subacetato de chumbo (sal de Horne), utilizando-se para esta um aparelho denominado sacarímetro automático (ACATEC) modelo DAS 2500, com peso normal igual a 26g aferido a 20°C, provido de tubo polarimétrico de fluxo contínuo e com saída para impressora e/ou registro magnético. Segundo Silva (2003), o funcionamento dos sacarímetros é baseado em princípios físicos, tomando como base as propriedades da luz e sua natureza ondulatória,

determinando assim a concentração de açúcares opticamente ativos, do tipo sacarose.

A partir da equação que exprime a lei de Biot (Caldas, 1998) determina-se o teor de sacarose na cana-de-açúcar:

$$C = \frac{100.\alpha}{L.\alpha'.\gamma}$$

Em que:

C= concentração de açúcar;

α = ângulo de rotação do plano de vibração da luz polarizada;

L = comprimento da coluna iluminada de líquido;

$\alpha'.\gamma$ = rotação específica.

É importante salientar que é necessária a correção da leitura para ajustar a temperatura ambiente em torno de 20°C, utilizando-se a seguinte equação:

$$L_{\text{ corrigida}} = L [1 + 255 \times 10^{-6}(T-20)]$$

Em que:

$L_{\text{ corrigida}}$ = POL. do caldo extraído (%);

L= leitura no sacarímetro;

T =temperatura ambiente.

Pol da Cana

Enquanto Pol% caldo representa a porcentagem de sacarose contida em uma solução de açúcares, enquanto que a Pol% cana é a porcentagem de sacarose existente na cana, caldo + fibra (Fernandes, 2000). No Estado de São Paulo, segundo este autor, uma cana para ser considerada madura deve apresentar Pol% cana variando de 14,4 (início da safra) a 15,3 (transcorrer da safra). Deuber (1988) afirma que uma cana-de-açúcar torna-se madura no momento em que apresentar um teor mínimo de sacarose com Pol% cana acima de 13. Ainda, segundo o autor, a maturação, na Região Centro-Sul, tem início nos meses de abril a maio. A evolução do processo de maturação, a partir do qual se

inicia o processo de decréscimo. Este processo define as curvas de maturação que são características das variedades e, ao mesmo tempo, influenciadas pelas condições de clima e solo.

Franco (2003), observou dados de Pol (caldo e cana) para a cana planta e a cana soca e desta forma verificou que os colmos foram colhidos após atingirem o ponto de maturação (Pol% cana com 14,7% na cana planta e 16,7% na cana soca). Segundo Fernandes (2000), este valor deve ser maior ou igual a 14,4%.

Percentagem de Açúcar Bruto (PCC)

O PCC é um índice que está diretamente relacionado ao valor econômico da tonelada da cana, ou seja, para valores elevados deste índice têm-se preços da cana compatíveis no mercado. Sendo o PCC determinado pela equação:

$$PCC = L_{corr} * (1 - 0,01 * FI) * C$$

Em que:

L_{corr} – Pol do caldo extraído (%)

FI – Fibra Industrial da Cana (%)

C – Fator de transformação de POL do caldo absoluto, este vale 0,955.

Pureza do caldo (%)

Segundo Lopes (1986), pureza é a relação entre o teor de sacarose de uma solução (porcentagem de sacarose dissolvida) e o teor total de açúcares, expresso em %. Este parâmetro mede a quantidade de açúcares contidos no caldo, quanto mais elevado for seu valor, implicará em uma menor quantidade de impurezas do caldo, e conseqüentemente o produto terá maior valor econômico.

A pureza é calculada com a percentagem de sólidos solúveis totais no caldo extraído, após a determinação dos valores de POL. e °BRIX. (Caldas, 1998).

$$PZA = \frac{POL_{\%caldo}}{^{\circ}BRIX_{\%caldo}}$$

Fernandes (1985) ainda completa que os valores de pureza do caldo ideais para considerar a cana-de-açúcar madura são de 80,0 e 85,0% para o início e decorrer da safra, respectivamente.

Além da sacarose, têm-se na cana os açúcares redutores (AR), que segundo Fernandes (2003) é o termo empregado para designar os açúcares glicose e frutose, principalmente. Porcentagens altas de açúcares redutores indicam baixa maturação. No processo industrial são produtos precursores de cor, isto é, participam de reações que aumentam a cor do açúcar, depreciando a qualidade do produto. Durante a maturação da cana-de-açúcar, à medida que o teor de sacarose se eleva os açúcares redutores decrescem de quase 2% para valores abaixo de 0,5% entre Março – Abril e Setembro – Outubro no Hemisfério Sul, podendo chegar a valores de 0,2%.

3.5. Potencial do uso de AH com bactérias endofíticas como insumo agrícola: um estudo relacionado à fenologia do milho.

O experimento foi realizado em condições de campo, na Fazenda dos Coqueiros, localizada no município de Casimiro de Abreu, no estado do Rio de Janeiro, na Rodovia Serramar, Km 02, na latitude de 22°28'28''S e longitude de 42°03'12'' W. Os tratos culturais foram executados de acordo com as recomendações técnicas para a cultura do milho na área. O plantio foi realizado em dezembro de 2007 e a colheita em maio de 2008. Foi realizada adubação de plantio 200 kg de 4-20-20 ha⁻¹.

A produtividade da variedade DKB 789 foi avaliada após plantio com aplicação de quatro tratamentos em três períodos distintos, referentes aos estádios fenológicos, via foliar com auxílio de um equipamento pressurizador costal (Figura1). O volume de calda utilizado foi de 400 Lha⁻¹.



Figura 1. Visão geral do experimento: A) Primeira aplicação, plantas com 4 folhas abertas e B) Segunda aplicação.

Os tratamentos foram os seguintes: (i) - bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum seropedicae* HIII 206, isolado de milho variedade BR 451); (ii) - ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (20 mg C_{AH} L⁻¹); (iii)- bactérias diazotróficas e ácidos húmicos e (iv) – controle. A diluição utilizada para calda foi de 1L de meio (DYGS) com bactérias crescidas (10⁹ células bacterianas) para

cada 20L de água. As épocas de aplicação dos tratamentos foram baseadas na fenologia da planta e ocorreram no momento em que as plantas apresentaram: (i) 4 folhas (1° estágio), (ii) 4 e 8 folhas (2 aplicações) e (iii) 8 folhas (2° estágio) abertas ou completamente expandidas.

As amostras para análise foliar foram obtidas segundo Martinez et al (1999). Em síntese, no momento do aparecimento da inflorescência feminina (cerca de 60 dias após o plantio), coletaram-se amostras de 20 folhas, abaixo e oposta das espigas de cada unidade experimental. Utilizou-se o terço (20 cm) das folhas sem a nervura central. A determinação dos teores de nutrientes foi de acordo com Malavolta et al. (1997).

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com 4 repetições. As parcelas foram constituídas de 6 linhas de 100 metros com espaçamento de 0,8m entre linhas, com 6 sementes por metro linear.

A colheita foi mecânica e realizada quando o grão estava com 18 a 22% de umidade. A população na ocasião da colheita foi estimada em torno de 45000 plantas ha⁻¹.

3.6. Efeito da aplicação de AH e bactérias diazotróficas com adubação nitrogenada sobre a produtividade do milho

Foi realizado em condições de campo, na Fazenda Ilha da Saudade, localizada no município de Macaé, no estado do Rio de Janeiro, na BR 101, Km 159, na latitude de 22°17'41'' S e longitude de 41°52'40'' W, em solo classificado como Organossolo (Embrapa, 1999), solos pouco profundos, mal drenados. O plantio foi realizado em maio de 2007 e a colheita em outubro de 2007. Foi realizada adubação de plantio 200 kg de 4-20-20 ha⁻¹. A adubação de cobertura não foi realizada. Os tratamentos culturais foram executados de acordo com as recomendações técnicas para a cultura do milho na área.

Avaliou-se a produtividade da variedade DKB 789 após plantio com a aplicação de oito tratamentos: (i) controle; (ii) bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum seropedicae* Hill 206; (iii) ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (20 mg C_{AH} L⁻¹); (iv) bactérias diazotróficas e ácidos húmicos; (v) – controle + 50 kg ha⁻¹ de N; (vi) bactérias diazotróficas + 50 kg ha⁻¹ de N; (vii) AH

+ 50 kg ha⁻¹ de N; e (viii) AH+ bactérias + 50 kg ha⁻¹ de N. A aplicação dos tratamentos foi via foliar e realizada no momento em que as plantas apresentaram 4 folhas completamente abertas, com auxílio de um trator e um implemento pressurizador. A adubação nitrogenada foi realizada manualmente no mesmo dia. A diluição utilizada para calda foi de 1L de meio (DYGS) com bactérias crescidas (10⁹ células bacterianas) para cada 20L de água. O volume de calda utilizado foi 400 Lha⁻¹. O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com 4 repetições. As parcelas foram constituídas de 6 linhas de cem metros com espaçamento de 0,8 m entre linhas, com 6 sementes por metro linear. A população estimada na ocasião da colheita foi em torno de 45000 plantas ha⁻¹.

3.7. Efeito da aplicação foliar de AH e bactérias endofíticas sobre a produtividade de cana-de-açúcar.

Os experimentos foram realizados em condições de campo, na Fazenda Abadia, localizada no município de Campos dos Goytacazes, no estado do Rio de Janeiro, na latitude de 21°43' S e longitude de 41°12' W, com 12 m de altitude, em solos predominantes classificados como Cambissolo (Embrapa, 1999), ainda em processo de desenvolvimento e com a presença de materiais de origem na massa do solo, com boa drenagem e textura argilo-siltosa, em torno de 38, 52 e 10% de argila, silte e areia, respectivamente. A análise química do solo evidenciou valores de pH (H₂O) = 5,5; S-SO₄ = 46,0 (mg dm⁻³); P = 3,5 (mg dm⁻³); K⁺ = 0,25 (cmol_c dm⁻³); Ca⁺⁺ = 4,5 (cmol_c dm⁻³); Mg⁺⁺ = 1,8 (cmol_c dm⁻³); Al⁺⁺⁺ = 0,1 (cmol_c dm⁻³); H⁺+Al = 3,8 (cmol_c dm⁻³); Na⁺ = 0,1 (cmol_c dm⁻³); C = 16,4 (g dm⁻³); M.O. = 28,5 (g dm⁻³); Fe = 68,0 (mg dm⁻³); Cu = 2,0 (mg dm⁻³); Zn = 2,1 (mg dm⁻³); Mn = 15,4 (mg dm⁻³) e B = 0,4 (mg dm⁻³). Os tratos culturais foram executados de acordo com as recomendações técnicas para a cultura de cana-de-açúcar na área. A variedade testada inicialmente foi a RB867515 (mineirinha).

Os tratamentos aplicados foram: (i) - bactérias diazotróficas (*Herbaspirillum seropedicae* HRC 54); (ii) - ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (20 mg C_{AH} L⁻¹); (iii)- bactérias diazotróficas e ácidos húmicos e (iv) – controle. A aplicação dos tratamentos foi via foliar e realizada aos 100 dias após o plantio, com auxílio de um equipamento pressurizador costal (Figuras 5 e

6A). A diluição utilizada para calda foi de 1L de meio (DYGS) com bactérias crescidas (10^9 células bacterianas) para cada 20L de água. O volume de calda utilizado foi 400 Lha^{-1} . Na Figura 2, encontra-se uma visão geral do experimento e aplicação dos tratamentos.

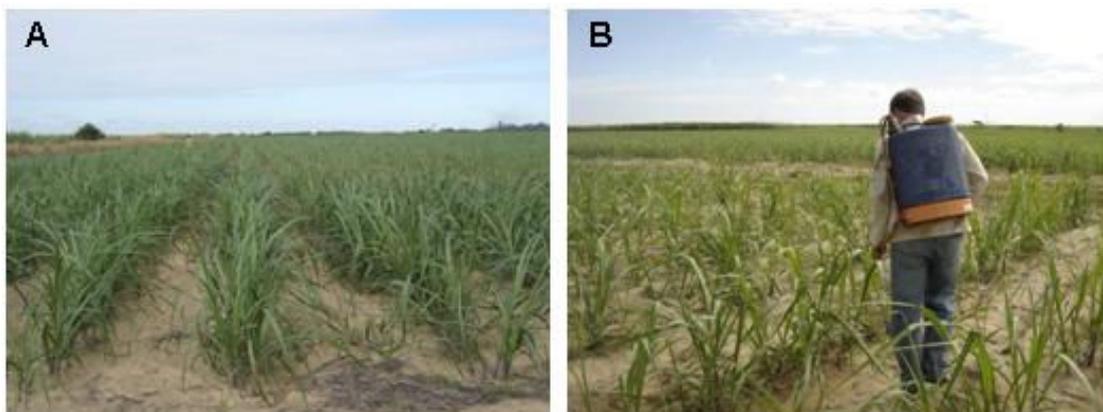


Figura 2 Visão parcial do experimento com cana-de-açúcar RB 867515 (A) e aplicação de ácidos húmicos e bactérias aos 90 dias após o plantio (B).

O delineamento experimental utilizado foi o Delineamento em Blocos Casualizados (DBC) com 4 repetições. As parcelas foram constituídas de 5 linhas de 10 metros com espaçamento de 1,30m entre linhas, 0,5 m entre plantas, com aceiro de dois metros entre parcelas. Avaliou-se a produtividade da cana-de-açúcar crua, variedade RB867515 referente aos respectivos tratamentos. Para esta avaliação, somente as 3 linhas de 5 metros centrais de cada parcela foram coletadas.

3.8. Potencial do uso de AH e bactérias diazotróficas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

3.8.1. Aplicação de AH e bactérias em mudas micropropagadas *in vitro*

Utilizou-se mudas de cana-de-açúcar da variedade NA 56.79 produzidas e cedidas pela Biofábrica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Leonel Miranda, provenientes da técnica de micropropagação. Os seguintes tratamentos foram aplicados *in vitro*:

- (i) controle, plantas crescidas em meio de cultura de tecidos MS;
- (ii) inóculo misto (IM) uma mistura de 5 estirpes bacterianas. Aplicou-se 1 mL de cada estirpe (10^9 células bacterianas) por frasco com mudas (50 mL de MS);
- (iii) ácidos húmicos (AH) isolados de vermicomposto. Foram aplicados 5 mL de AH ($20 \text{ mg C}_{\text{AH}} \text{ L}^{-1}$) por frasco (50 mL de MS);
- (iv) uso combinado do IM com AH ($20 \text{ mg C}_{\text{AH}} \text{ L}^{-1}$).

A inoculação das bactérias foi realizada ao final do período de enraizamento das plântulas, na fase III do processo de micropropagação. O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) tradicional foi modificado pela supressão de hormônios e vitaminas e uso de 1/10 da concentração original de açúcares e minerais conforme Reis et al (1999).

Sete dias após a aplicação *in vitro* dos tratamentos realizou-se contagem das bactérias conforme item 3.3.

3.8.2 Preparo do Inóculo Misto e do acondicionamento das mudas

Os inoculantes foram preparados utilizando estirpes puras dos padrões dos microrganismos diazotróficos endofíticos como descrito na Tabela 2. As cinco estirpes utilizadas nesta tese foram inicialmente testadas e selecionadas por Oliveira (2003) em seus estudos de inoculação das plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar variedades SP701143 e SP813250, em diferentes ambientes de produção como Seropédica-RJ, Piracicaba-SP e Jaú-SP.

Tabela 2. Microrganismos endofíticos e partes da planta de cana-de-açúcar de obtenção das estirpes

Espécies	Estirpe	Partes da Planta	Cana-de-açúcar
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR 11281	Raízes	<i>Shaccharum sp.</i> (híbrido)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR 11335	Raízes	SP701143
<i>H. rubrisubalbicans</i>	BR 11504	Colmos	SP701284
<i>Azospirillum amazonense</i>	BR 11145	Colmos	CB453
<i>Burkholderia tropica</i>	BR 11366	Perfilhos	SP711406

Todas as estirpes estão depositadas da coleção de culturas da Embrapa-Agrobiologia

Após 7 dias de inoculação, as plantas foram transferidas para bandejas de isopor de 128 células com substrato de 1:1:1 de areia, terra e torta de filtro, para serem aclimatizadas em telado (sombrite 50%) e viveiro por um período de 90 dias, conforme rotina de produção de mudas da Biofábrica da Estação Experimental do Campus Leonel Miranda - UFRRJ. As mudas não receberam fertilização química, sendo apenas irrigadas diariamente quando necessário.

3.8.3. Ensaio de campo: avaliação do crescimento, produtividade e características agroindustriais

Para avaliar o potencial das mudas micropropagadas tratadas com AH e bactérias, neste experimento foram utilizadas as mudas micropropagadas restantes, avaliadas na fase de aclimatização sob telado (sombrite 50%). As mudas foram transplantadas das bandejas de isopor para o campo após 90 dias da fase de aclimatização.

Estas mudas foram levadas para o campo em um experimento em faixas com parcelas subdivididas com quatro repetições. Nas parcelas foram aplicados o equivalente a 0, 10 e 20 Mg de vermicomposto ha⁻¹, e nas subparcelas foram dispostas as mudas com os seguintes tratamentos: (i) - mudas inoculadas com bactérias diazotróficas; (ii) - mudas tratadas com ácidos húmicos; (iii)- mudas tratadas com o uso combinado de bactérias diazotróficas e ácidos húmicos e (iv) -

mudas sem tratamento. Na Figura 3, é demonstrada uma visão geral do experimento.



Figura 3. Visão parcial do ensaio de campo: pesagem do vermicomposto (A), distribuição do vermicomposto nas linhas de plantio (B), plantio no campo (C).

As parcelas foram constituídas de uma linha de 30 metros com espaçamento de 1,40 entre linhas, 0,5 m entre mudas, com aceiro de dois metros entre parcelas. Verificou-se a persistência do efeito do uso em conjunto de AH e bactérias diazotróficas endofíticas sobre a taxa de mortalidade das mudas. Em seguida realizou-se o replante das mudas.

3.8.4.1 Localização e características climáticas

O experimento foi conduzido em condições de campo de março de 2005 a agosto de 2008 na área experimental da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Leonel Miranda, localizado na Estrada do açúcar, s/n, Penha, no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. Sua localização geográfica se dá no paralelo 21°43'52'' de latitude sul e o meridiano 41°12'50'' de longitude oeste em uma altura de 8 m em relação ao nível do mar.

Na figura 4, são apresentados dados da precipitação pluviométrica nos anos de 2005 a 2008, caracterizando o período seco (junho a setembro) e chuvoso (outubro a maio) no Rio de Janeiro, RJ. As características climáticas da região indicam que há um clima quente e úmido, sem inverno pronunciado, sendo o regime pluviométrico caracterizado por um período chuvoso no verão e estiagem no inverno.

Análise de solo, realizada de acordo com Embrapa (1997), indicaram na amostra de 0-20 cm: pH em água 4,7; $\text{Ca}^{++} = 7 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$; $\text{Mg}^{++} = 4 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$; $\text{Al}^{+++} = 2 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$; $\text{P} = 7,1 \text{ mg}.\text{dm}^{-3}$; $\text{K} = 40,2 \text{ mg}.\text{dm}^{-3}$, carbono orgânico (C.O.)= $6,3 \text{ g kg}^{-1}$, matéria orgânica (M.O.)= $10,9 \text{ gk}.\text{g}^{-1}$. O preparo do foi através de uma aração e posterior gradagem e não recebeu adubação mineral e nem sofreu correção de acidez. Após o transplante foi realizada irrigação por aspersão.

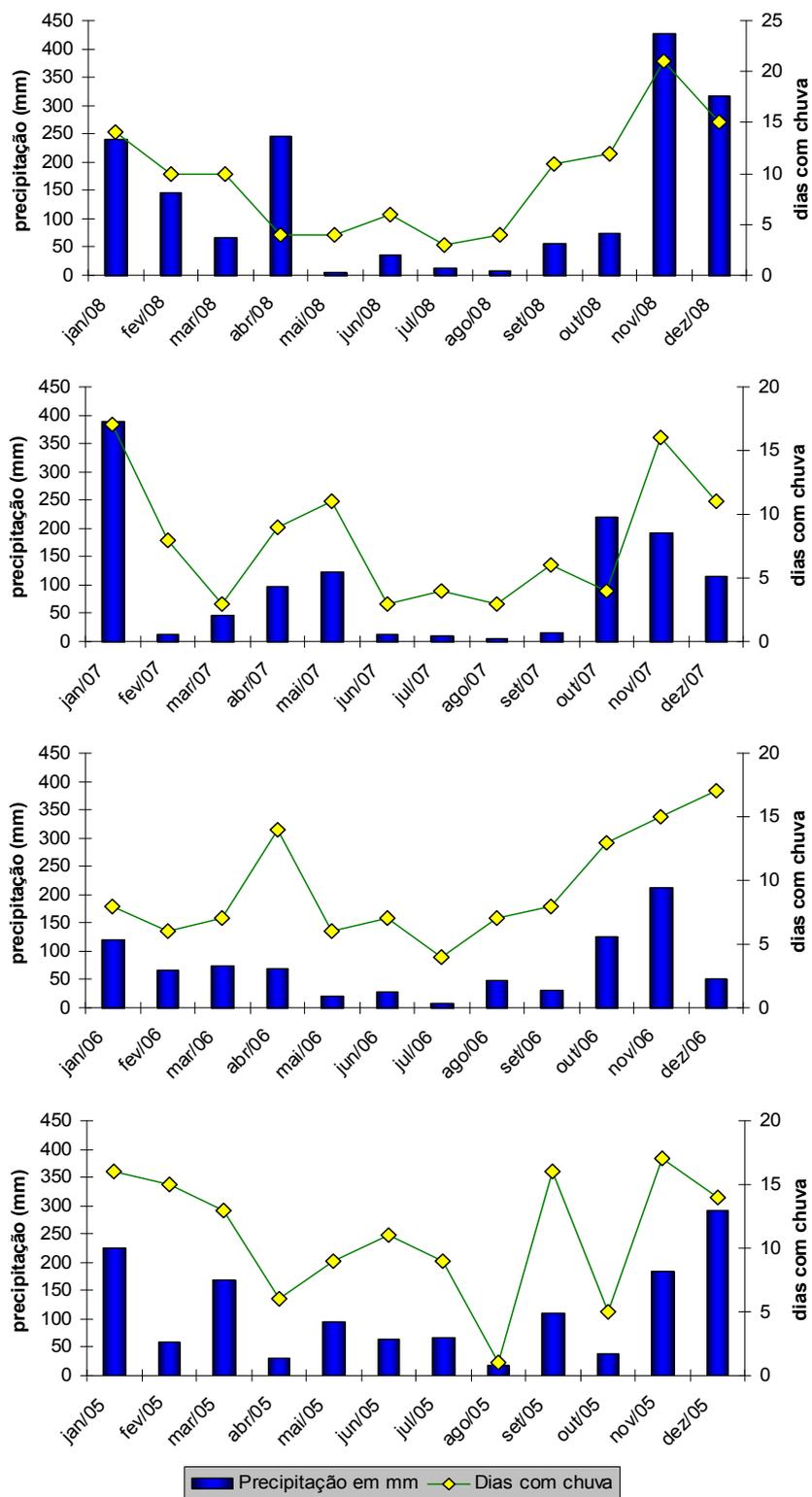


Figura 4. Chuva acumulada x número de dias com chuvas para os anos 2005 (a), 2006 (b), 2007 (c) e 2008 (d) em Campos dos Goytacazes, RJ. Fonte: Estação meteorológica da UFRRJ, Campus Leonel Miranda.

A precipitação anual para os anos de 2005, 2006, 2007 e 2008 foi de 1347,30; 853,60; 1234,70 e 1635,80 mm, respectivamente.

3.8.4.2 Colheitas e características avaliadas

A primeira colheita do experimento (cana planta) foi realizada em agosto de 2006 aos 16 meses após o plantio, a segunda colheita (1ª cana soca) foi em agosto de 2007 aos 12 meses após a 1ª colheita e 28 meses após o transplante e a terceira colheita (2ª cana soca) foi em agosto de 2008 aos 12 meses após a 2ª colheita e 40 meses após o transplante. Durante a colheita a cana-de-açúcar foi separada em colmo, ponteiros (folhas verdes) e palha (folhas secas). Estimou-se a produtividade da lavoura (rendimento de colmos frescos), através de pesagem em campo.

Para análise foliar, coletaram-se amostras de 20 folhas aleatoriamente de cada unidade experimental. Em seguida foram utilizados os 20 centímetros medianos (terço médio), descartando-se a nervura central. Estas amostras foram submetidas à secagem em estufa a 70°C com circulação forçada de ar por 72 horas e moídas em moinho tipo Wiley (com peneiras de 20 mesh). O teor de fósforo foi analisado colorimetricamente pelo método do molibdato, o teor de potássio foi analisado por espectrofotometria atômica de emissão de chama, os teores de Ca, Mg, Mn, Zn e Cu foram analisados por espectrofotometria de absorção atômica e o teor de enxofre foi analisado por turbidimetria após digestão do material seco (0,5 g) com ácido nítrico 65% (4 mL) e ácido perclórico 70% (2 mL).

As características agroindustriais avaliadas foram: (i) – Teor de Fibra; (ii) – Teor de pureza; (iii) – grau Brix; (iv) - pol % cana (% de sacarose por colmo); (v) – número de colmos por parcela; (vi) – peso médio do colmo; (vii) – peso da parcela; (viii) – TCH (total de cana por hectare) e (ix) – TPH (total de pol por hectare). Para avaliação destas características industriais foram retiradas de cada tratamento uma subamostra de 10 colmos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Potencial do uso de AH com bactérias endofíticas como insumo agrícola: um estudo relacionado à fenologia do milho.

Os resultados da contagem do número mais provável de bactérias diazotróficas endofíticas são apresentados na Figura 5. Observou-se que a população de endofíticos não sofreu influência da época de aplicação. Já em relação aos tratamentos, aqueles constituídos de bactérias apresentaram maiores populações nos tecidos vegetais, variando de 30 a 45% para bactéria e AH+bactéria em relação ao controle.

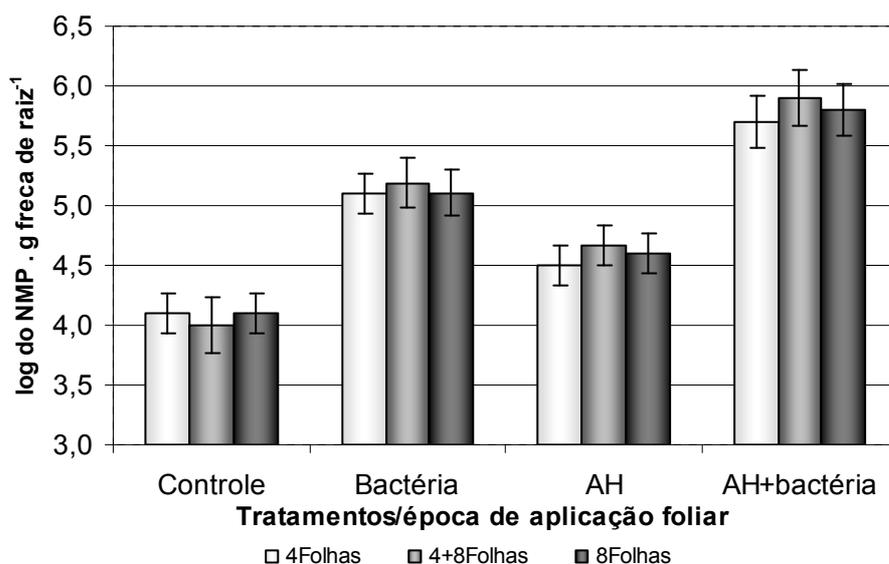


Figura 5. Log do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas por grama de raiz fresca em resposta à pulverização foliar em diferentes estádios fenológicos de milho DKB 789, crescidas em meio JNFb.

É importante destacar que a presença de AH além de não inibir a população de células bacterianas proporcionou o estímulo destas. Este fato também foi observado em condições de laboratório por Marques Jr (2006) utilizando milho e diferentes fontes de AH. O NMP de bactérias encontrado no controle e em plantas que receberam apenas AH é justificado pela população nativa.

Teores foliares de macro e micronutrientes foram avaliados pelo critério de faixa de suficiência, de acordo com Martinez et al (1999), tomando-se como referência dados considerados adequados para culturas produtivas de milho, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Teores foliares de nutrientes considerados adequados para a cultura do milho.

Macronutrientes	Teor (g Kg⁻¹)	Micronutrientes	Teor (mg kg⁻¹)
Nitrogênio	27,5 - 32,5	Boro	4-20
Fósforo	2,5 - 3,5	Cobre	6-20
Potássio	17,5 - 22,5	Ferro	20-250
Cálcio	2,5 - 4,0	Manganês	20-150
Magnésio	2,5 - 4,0	Molibdênio	0,15-0,20
Enxofre	1,0 - 2,0	Zinco	20-70

Fonte: Martinez et al (1999)

Os resultados das análises foliares com teores médios de macronutrientes e micronutrientes em função dos tratamentos estão na Tabela 4. Em referência aos teores de N, observou-se que apenas o tratamento controle apresentou-se abaixo da faixa de suficiência de acordo com Martinez (1999). As plantas que receberam bactérias diazotróficas, apresentaram os maiores teores de N, totalizando incrementos de 11,74 e 19,69%, devido aos tratamentos bactéria e AH+bactéria em relação ao controle.

Tabela 4. Teores médios de macronutrientes e micronutrientes na folha de milho DKB 789 em função dos tratamentos

	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	
	g Kg ⁻¹					-----mg kg ⁻¹ -----				
Controle	27,32 C	3,55 AB	35,09 A	3,19 B	2,03 B	98,39 C	16,92 C	42,45	41,19 C	
Bactéria	30,53 AB	3,00 B	27,90 B	3,91 A	2,59 A	122,92 AB	19,17 BC	34,50	46,17 BC	
AH	29,00 BC	3,83 A	36,25 A	4,22 A	2,56 A	120,67 BC	20,08 B	36,16	55,17 AB	
AH+Bactéria	32,71 A	3,38 AB	29,15 B	4,20 A	2,77 A	144,33 A	23,67 A	41,00	63,83 A	
F	9,56**	4,99**	8,80**	4,68**	4,76**	9,61**	11,65**	1,13ns	13,96**	
CV%	8,59	15,62	15,34	12,62	13,81	17,25	14,25	32,19	17,98	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem pelo teste Tukey. ns, * e ** representam: não significativo, significativo pelo teste F com p<0,05 e p<0,01.

Estes resultados indicam um potencial de bactérias diazotróficas em proporcionar aumento nos teores de N na cultura do milho em condições de campo, após pulverização foliar. Já, folhas tratadas apenas com AH apresentaram resultados que não se diferenciaram estatisticamente do controle. Contudo, ao pulverizar AH com bactérias, o resultado foi maior que o controle, ou seja, a presença de AH em solução com bactérias não inibiu o potencial destas.

Para o nutriente P, folhas de plantas controle e aquelas com AH apresentaram-se acima da faixa de suficiência (Tabelas 3 e 4). As plantas que receberam aplicação de apenas bactérias proporcionaram teores um pouco abaixo (4,87%) que o controle, porém estatisticamente iguais. Já os AH foram responsáveis pelos incrementos de 27,66, 13,31 e 7,88% em relação às bactérias, AH+Bactérias e controle, sendo que somente o maior estímulo foi considerado diferente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (Tabela 4).

Segundo Martinez (1999), todos os tratamentos proporcionaram teores classificados como consumo de luxo para o K. Este elemento apresentou-se em menores teores, quando as bactérias estavam presentes, alcançando a redução de 20,4% para apenas bactérias e 16,92% para AH+bactérias em relação ao controle (Tabela 4).

Todos os tratamentos causaram incrementos de teores de Ca nas folhas em relação ao controle. Contudo, os tratamentos com apenas AH e AH+bactérias foram classificados como consumo de luxo. Semelhantemente, comportaram-se os teores de Mg, porém todos dentro da faixa de suficiência com exceção do controle que se apresentou um pouco abaixo (Tabela 4).

Observando-se os teores de micronutrientes, nota-se que todos foram classificados dentro da faixa de suficiência, com excessão do Cu, que ultrapassou esta faixa com ambos os tratamentos que continham AH, proporcionando incrementos de 39,89 e 18,67% para AH+bactéria e AH, em relação ao controle. Para o nutriente Fe, o destaque foi para o tratamento AH+bactérias com 46,69% de estímulo em relação ao controle e aproximadamente 23,78% em relação aos demais tratamentos. Os maiores teores de Mn foram devido aos tratamentos em que o AH estava presente com até 54,96% a mais em relação ao controle. Apesar de suficientes segundo Martinez et al (1999), os teores de Zn foram os únicos dentre os analisados neste trabalho em que os tratamentos não proporcionaram diferenças pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Para os resultados referentes às épocas de aplicação, somente os teores de Ca e Cu foram significativos e estão apresentados na Tabela 5. Para ambos os nutrientes, a aplicação dos tratamentos no primeiro estágio (4 Folhas) foi maior do que no segundo (8 Folhas) e classificada como consumo de luxo. Os tratamentos aplicados nos dois estádios para mesma planta (4+8 Folhas) apresentaram-se de forma intermediária.

Tabela 5. Teores médios de cálcio e cobre na folha de milho DKB 789 em função das épocas de aplicação.

	Ca	Cu
	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹
4 Folhas	4,16 A	21,25 A
4+ 8 Folhas	3,84 AB	20,00 AB
8 Folhas	3,64 B	18,62 B
F	4,68**	11,65**
CV(%)	12,62	14,25

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna não diferem pelo teste Tukey a 1%.

Os resultados de produtividade obtidos após a colheita mecânica encontram-se na Tabela 6. Em relação à época de aplicação, ao comparar a produtividade do tratamento AH+bactérias nas três épocas avaliadas, verificou-se que o respectivo tratamento proporcionou maiores produtividades com duas aplicações (4+8 folhas) e com uma aplicação no 2º estágio fenológico (8 folhas). Os incrementos na produtividade chegaram a aproximadamente 26,60 e 17,43% em relação ao 1º estágio. Segundo Deuner et al (2008), em plantas de milho há uma intensa absorção de N nas fases iniciais de desenvolvimento, sendo a deficiência deste uma das maiores limitações à produtividade. Seus resultados sugerem que a cultura do milho na fase inicial é mais eficiente em absorver N inorgânico pelas raízes em comparação com adubação foliar. Este fato pode ser uma possível explicação para os melhores resultados com as plantas mais velhas, aquelas com maior número de folhas.

É importante ressaltar que o tratamento apenas bactéria, demonstrou-se independente da época de aplicação, pois, não proporcionou diferentes

produtividades nos distintos períodos fenológicos. Assim como esperado para as plantas controle, que não receberam nenhum tratamento nas diferentes épocas de aplicação. Já os efeitos na produtividade ocasionados pelo tratamento AH, em relação às épocas de aplicação, apresentaram-se de forma dependente do estágio fenológico, uma vez que aumentos de até 90,37% foram alcançados quando se pulverizou plantas com 8 folhas expandidas (2° estágio) em relação a plantas com apenas 4 folhas (1° estágio). Ao realizar duas aplicações (4+8 folhas), observaram-se incrementos de até 34,65% na produtividade comparados com somente uma aplicação no 1° estágio fenológico (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da aplicação foliar de ácidos húmicos e bactérias endofíticas e da combinação de AH+bactérias sobre a produtividade de milho DKB789 em diferentes estádios fenológicos.

TRATAMENTO	ÉPOCA DE APLICAÇÃO		
	4 folhas	4 e 8 folhas	8 folhas
	Mg ha ⁻¹		
AH+Bactéria	3,883 Ab	4,916 Aa	4,560 Aa
BACTÉRIA	3,563 ABa	3,883 ABa	3,241 Ba
CONTROLE	2,679 ABa	2,636 Ba	2,768 Ba
AH	1,746 Bb	2,351 Bab	3,324 Ba
F	6,43*	4,15*	2,96*
CV(%)	26,78		

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem pelo teste Tukey a 5%.

Ao analisar o efeito dos tratamentos sobre a produtividade dentro do 1° estágio (4 folhas), observou-se que os únicos tratamentos que se apresentaram diferentes foram AH+bactéria e AH. Ao aplicar apenas AH ou somente bactérias nas folhas, as respostas variaram do controle em torno de 33%, mas não o suficiente para caracterizar diferença pelo teste tukey a 5% de probabilidade. Porém, ao combinar o tratamento AH com bactérias, o estímulo da produtividade foi cerca de 122%, suficiente para diferenciar os tratamentos AH e AH+bactérias (Tabela 6).

Quando se realizou duas aplicações (4+8 folhas), o efeito do tratamento AH+ bactérias foi em média 90,06% superior à produtividade das plantas controle e daquelas que receberam apenas AH. Verificou-se que com estas aplicações, a presença dos AH não inibiu o potencial das bactérias em estimular a produtividade.

No 2° estágio (8 Folhas), os resultados da aplicação de AH+bactérias foram superiores em média 46,57% aos demais tratamentos. Nesta fase, a evidência de que a presença de AH na solução não inibe o efeito das bactérias fica mais pronunciada, pois os efeitos de cada tratamento isolado, não são suficientes para se igualar aos resultados da combinação AH+bactérias. Neste estágio fenológico, o colmo além de suportar as folhas e partes florais, atua também como órgão de reserva. Tal acúmulo ocorre após o término do desenvolvimento vegetativo e antes do início do enchimento de grãos, já que, até esse ponto, todo carboidrato foi utilizado na formação de novas folhas (Magalhães & Paiva, 1993). Fancelli & Dourado-Neto (2000) afirmaram que o principal evento relacionado ao 2° estágio (8 folhas) refere-se à ocorrência da definição do potencial produtivo das plantas através da diferenciação do meristema apical, justificando a importância de nitrogênio disponível nesta fase. A aplicação de AH+bactérias foi capaz de promover a produtividade por períodos limitados de máxima definição do potencial produtivo da cultura do milho.

Os resultados da presente investigação, refletem aos encontrados por Marques Jr (2006) em plântulas de milho em condições de laboratório. Este trabalho demonstrou que o uso de AH e bactérias afeta de maneira positiva os aspectos bioquímicos e morfológicos, bem como em função da dose e fonte, influencia o número populacional de bactérias associadas às raízes da planta, e conseqüentemente a magnitude de resposta à inoculação, em plântulas de milho. Conceição et al (2008), estudaram o efeito do recobrimento de sementes de milho com AH, bactérias diazotróficas endofíticas e o uso em conjunto de AH e bactérias na estimulação do crescimento vegetal e na população de bactérias estabelecidas na planta hospedeira. Os autores observaram que a adição de AH, bactérias e o uso em conjunto estimularam o crescimento vegetal. Verificaram ainda que os AH utilizados no recobrimento de sementes de milho têm menor capacidade de estimular o crescimento radicular, em comparação ao uso em solução. O efeito benéfico da inoculação também pode estar relacionado com a

estirpe inoculada, em que estirpes isoladas da mesma planta apresentaram melhores resultados (Döbereiner & Baldani, 1982; Reynders & Vlassak 1982; Boddey et al., 1986). Estes trabalhos demonstram o potencial do uso de AH+bactérias para estimular plantas. Os estudos precisam avançar para elucidação das causas destas respostas a fim de maximizar a produtividade.

Em síntese, os dados demonstraram que o estágio fenológico da planta influenciou na capacidade da combinação AH+bactérias em proporcionar aumento de produtividade, levando o potencial produtivo até o segundo estágio de desenvolvimento do milho.

O conhecimento da época mais adequada de fornecimento de AH e bactérias endofíticas na lavoura de milho é imprescindível ao desenvolvimento de estratégias de manejo que aumentem o seu aproveitamento.

4.2. Efeito da aplicação de AH e bactérias diazotróficas com adubação nitrogenada sobre a produtividade do milho

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de ácidos húmicos, bactérias diazotróficas e a adubação nitrogenada sobre a produtividade agrícola do milho var DKB 789 utilizando o manejo de plantio direto. O efeito visual da aplicação de aplicação foliar de AH e bactérias diazotróficas endofíticas (HIII206) encontra-se na Figura 6.

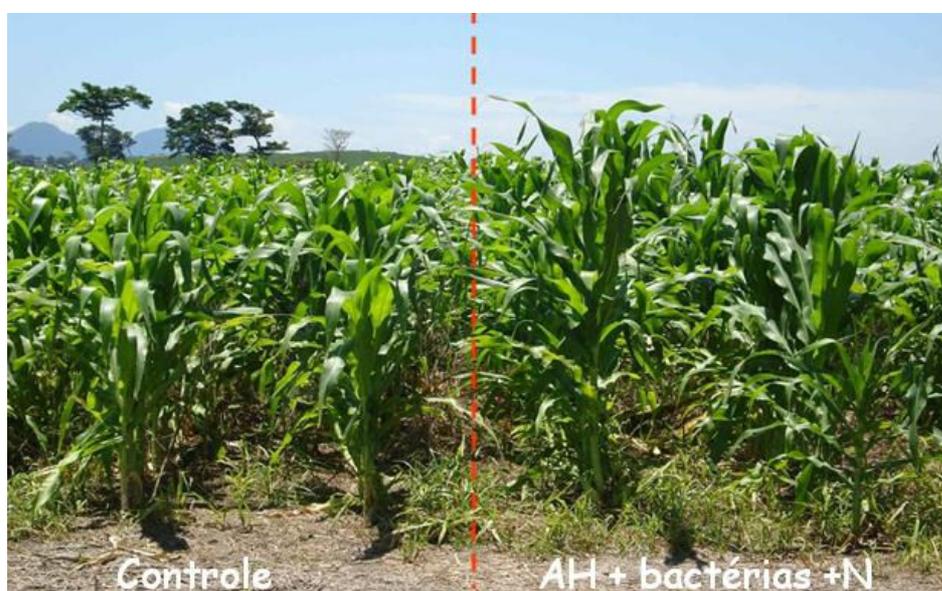


Figura 6. Efeito visual da aplicação de aplicação foliar de ácidos húmicos (20mgCL^{-1}) e bactérias diazotróficas endofíticas (HIII206) no milho DKB 789. Controle à direita e AH + bactérias + N à esquerda.

Os resultados deste ensaio encontram-se na Tabela 7. Verificou-se que os tratamentos AH, bactéria e AH+bactéria que receberam adição de N, foram superiores aos mesmos na ausência deste elemento. O incremento na produção de grãos foi de 35,27% para AH+bactéria com N em relação à AH+bactéria sem N. Já para bactéria com N o estímulo foi de 34,63% em relação a apenas bactéria. O tratamento AH e bactérias com N, proporcionou incremento de 34,88% em relação ao controle nitrogenado e 85,25% em relação ao controle absoluto (sem N).

Quando comparados o controle absoluto (sem N) e o controle nitrogenado, a porcentagem de incremento de produção é de aproximadamente 37,35%. Outro fato que merece destaque é que o uso combinado de AH+bactéria, com ou sem N, é capaz de provocar respostas significativas em relação aos seus respectivos controles (com e sem N).

Tabela 7. Produtividade agrícola do milho var DKB 789 em plantio direto, tratado com ácidos húmicos, bactérias diazotróficas endofíticas e adubação nitrogenada.

Tratamentos	Produtividade média de grãos	
	Mg ha ⁻¹	
AH + Bactéria + N	5812,50	A
Bactéria + N	5406,25	A
AH + N	4718,75	AB
Controle + N	4309,38	B
AH + Bactéria	4296,88	B
Bactéria	4015,63	BC
Controle	3137,50	C
AH	2987,50	C
CV(%)	27,07	
F	2,96*	

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem pelo teste Tukey a 5%.

O uso de AH+bactéria também proporcionou resultados semelhantes aos apresentados pelas plantas que receberam apenas adubação nitrogenada (controle com N) (Tabela 7).

Pesquisas envolvendo bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada em diversas culturas como: abacaxi (Werber et al, 2004), mamão (Lima et al, 2009), trigo (Sala et al, 2007) e banana (Werber et al, 2003), têm demonstrado o benefício deste manejo. Machado et al (2003), pesquisando sobre efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no milho, concluíram que houve efeito da adubação em todos os caracteres bioquímicos avaliados e a inoculação apresentou efeito na atividade da enzima glutamina sintetase na raiz a partir da reação da transferase.

A absorção de N pelas plantas de milho na forma de amônia e a produção de amônia pelas bactérias, fazem com que o ambiente externo da planta (solo e

rizosfera) e interno (espaço inter e intramembranas) tenham um pH mais baixo. Nas regiões tropicais as variedades de milho devem ter certa adaptabilidade na aquisição de N na forma de amônia (Machado & Magalhães, 1995), tolerância a pH baixo (Machado & Magnavaca, 1991), além de tolerância a outros tipos de estresse, pois essas situações prevalecem em solos tropicais sujeitos a freqüentes estresses bióticos e abióticos. Conseqüentemente, é de se supor que as bactérias diazotróficas eficientes nos mecanismos de fixação de nitrogênio em milho podem ter adaptabilidade a pH baixo e ser tolerantes a amônia (Lin et al., 1989). Além disso, outros fatores influenciam no aumento da produtividade de grãos como a eficiência de absorção de N pela cultivar e sua translocação para os grãos em crescimento, onde ocorrerá a formação dos compostos de reserva.

Marques Jr (2006) avaliando o efeito do uso combinado de AH e *Herbaspirillum seropedicae* sobre características morfológicas de plântulas de milho, em condições de laboratório, encontrou incrementos de até 81% de massa seca em relação ao controle. No presente trabalho, em condições de campo, observou-se respostas de até 27,98% da aplicação de bactérias em relação ao controle absoluto (sem N). Para o tratamento com apenas AH, sugere-se que os resultados poderiam ser melhores caso a aplicação fosse realizada no segundo estágio de desenvolvimento do milho, como constatado no experimento do item anterior envolvendo época de aplicação. É importante lembrar que neste ensaio a aplicação foi mecanizada, o que torna mais difícil a aplicação no 2º estágio de desenvolvimento.

Aumentar a eficiência por meio de novos insumos agrícolas, baseado em ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, no manejo, pode ser um meio de melhorar a produtividade. Entretanto, ainda é necessário conhecer melhor os mecanismos envolvidos neste processo para otimizá-lo.

4.3. Efeito da aplicação foliar de AH e bactérias endofíticas sobre a produtividade de cana-de-açúcar.

Este experimento teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação foliar de AH e bactérias sobre a produtividade da cana-de-açúcar var. RB 867515 em condições de campo espessas em TCH (Tonelada de Cana por Hectare) e TPH (Tonelada de Pol por Hectare). Os resultados dos teores de nutrientes foliares e das demais características agroindustriais estão na Tabela 8.

Tabela 8. Teores médios de macronutrientes nas folhas da cana-de-açúcar var RB 867515 (cana-planta).

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg
			g Kg ⁻¹		
Controle	10,01	1,17	11,37	6,43	1,98
Bactéria	10,09	1,14	12,11	5,57	1,91
AH	9,97	1,15	12,54	5,19	1,84
AH+bactéria	10,40	1,25	12,41	5,69	1,90
F	0,49ns	1,08ns	0,67ns	1,52ns	1,17ns
CV%	9,35	8,57	2,05	12,97	26,57

*Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Tukey a 5%. Ns – não significativo.

Observou-se que não houve efeito dos tratamentos sobre os teores de macronutrientes (Tabela 8), assim como para as características agroindustriais apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Características agroindustriais da cana-de-açúcar RB 867515 (cana-planta).

Tratamentos	BRIX	FIBRA	POL	PCC	PUR
			%		
			----- 0 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----		
Controle	20,73	10,89	18,25	15,15	86,12
Bactéria	20,58	10,84	18,16	14,98	85,61
AH	20,71	11,18	18,37	15,06	88,17
AH+bactéria	20,57	10,74	17,90	14,96	86,14
CV (%)	2,21	3,72	2,54	2,61	1,83
F	0,56ns	1,39ns	1,13ns	0,67ns	1,63ns

*Médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste Tukey a 5%. Ns – não significativo.

Os resultados de produtividade obtidos pela pesagem dos colmos encontram-se na Tabela 10. Verificou-se que os efeitos sobre a TCH e TPH foram de maneira semelhante.

Tabela 10. Efeito da aplicação foliar de bactérias diazotróficas endofíticas (HRC 54), ácidos húmicos extraídos de vermicomposto (20 mg CAH L⁻¹) e da aplicação de bactérias + ácidos húmicos sobre a produtividade de cana-de-açúcar var. RB867515 em condições de campo.

Tratamentos	TCH	TPH
	Mg ha ⁻¹	
AH + Bactéria	221,15 A	36,89A
Bactéria	183,31 AB	31,64AB
Controle	179,46 B	29,21 B
AH	168,54 B	28,73 B
CV (%)	9,19	7,14
F	6,99**	4,77*

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna não diferem pelo teste Tukey a 5%. ns, * e ** representam: não significativo, significativo pelo teste F com $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

A cana-de-açúcar respondeu à aplicação foliar de AH+Bactéria com aumento de produtividade em aproximadamente 23,23% em relação ao controle. Apesar da produtividade referente ao tratamento com apenas AH não se distinguir do controle, a presença de AH junto com bactérias, não inibiu o efeito destas, pelo contrário provocou estímulo de 20,64% suficiente para se diferenciar dos resultados de apenas AH e do controle. Respostas com magnitudes semelhantes foram encontradas por Silva (2009), testando inoculantes com a mistura de bactérias diazotróficas endofíticas e polímeros. O autor constatou um aumento médio da produtividade das variedades RB72454 e RB867515 de 50 e 30 Mg ha⁻¹.

É importante ressaltar que como não foi observado aumento nos teores foliares de N com os tratamentos com bactérias (Tabela 9), mas foi verificado estímulo na produtividade, sugere-se que a causa destes efeitos esteja relacionada à capacidade de promoção de crescimento vegetal por bactérias, devido à produção de fitormônios que são capazes de promover o desenvolvimento e proliferação das raízes, resultando em uma absorção eficiente de água e nutrientes (Mirza et al., 2001; Olivares et al, 2002).

Govindarajan et al. (2007), avaliaram a inoculação de estirpes de *Klebsiella* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Burkholderia vietnamiensis* e *Azospirillum lipoferum*, juntamente com adubação de 140 kg ha⁻¹ de N fornecido à cana-de-açúcar micropropagada variedade CoV 92102. Os autores verificaram que tanto a inoculação de *Klebsiella* sp. como *G.diazotrophicus*, associada à adubação de 140 kg ha⁻¹ de N, promoveu as maiores produções de massa de matéria seca (3,7 e 3,1g por planta, respectivamente), acima do controle fertilizado com 280 kg N ha⁻¹ até seis meses após o plantio.

A magnitude das respostas de produtividade encontrada no presente trabalho é considerada promissora, pois para região Norte-Noroeste Fluminense a média de produtividade desta variedade na região é de aproximadamente 65 Mg ha⁻¹ (Asflucan, 2009).

Apesar de pesquisas envolvendo uso de bactérias em cana-de-açúcar se mostrarem cada vez mais presentes, ainda não está bem claro qual é a melhor forma de aplicação e pouco se conhece sobre o uso de aplicação foliar. No presente trabalho, este tipo de aplicação mostrou-se eficiente.

4.4. Potencial do uso de AH e bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do uso de AH e bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar na fase de aclimatização e, posteriormente, na fase de estabelecimento da lavoura experimental no campo. Uma visão geral do experimento e dos resultados encontra-se na Figura 7.



Figura 7. Visão geral do experimento. Cana-de-açúcar micropropagada in vitro, na fase de aclimatização em casa de vegetação e no campo.

4.4.1 Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar.

Os resultados da contagem de bactérias encontram-se nas Tabelas 11 e 12. Observou-se logo após a inoculação, conforme esperado, maiores populações em mudas tratadas com bactérias. Para o tratamento com apenas bactérias, estes incrementos variaram de 48,42 a 98,04% em relação ao controle. A presença de bactérias nos tratamentos controle e AH é justificada pelo desenvolvimento da população natural na cana-de-açúcar. A aplicação de AH demonstrou capacidade de influenciar na população de *Azospirillum* com estímulo de 43,65% em relação ao controle. Para as demais espécies bacterianas os estímulos de AH em relação ao controle não foram significativos.

Tabela 11. População de bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar aos 7 dias após a inoculação.

Tratamento	LGI-P	JNFb	LGI	JMV
	Log n° de células.g fresca de raiz ⁻¹			
Controle	4,14 C	5,08 B	4,65 C	4,09 C
Bactéria	8,01 A	7,54 A	8,08 A	8,10 A
AH	5,40 BC	5,54 B	6,68 B	5,67 C
AH+Bactéria	7,06 AB	8,12 A	8,14 A	7,74 B
CV (%)	9,46	7,20	3,49	5,0
F	12,40**	3,16*	10,40**	10,05**

LGI-P- *Gluconacetobacter diazotrophicus*; JNFb – *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*; LGI – *Azospirillum amazonense*; JMV – *Burkholderia* sp.

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem pelo teste Tukey a 5%. * e ** representam significativo pelo teste F com $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

É importante observar que a presença de AH junto com bactérias, não teve efeito significativamente negativo na população de *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* e *Azospirillum*.

Em referência à fase de aclimatização, as maiores populações de *Herbaspirillum* e *Gluconacetobacter* foram devido ao tratamento AH+ bactéria,

demonstrando o estabelecimento da resposta apresentada na primeira contagem (Tabela 12).

Tabela 12. População de bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar aos 60 dias após a inoculação.

Tratamento	LGI-P	JNFb	LGI	JMV
	Log n° de células.g fresca de raiz ⁻¹			
Controle	3,36 B	4,98 B	4,56 AB	4,38 B
Bactéria	6,14 A	5,86 B	4,77 AB	7,67 A
AH	3,24 B	4,95 B	3,48 B	4,84 B
AH+Bactéria	6,37 A	7,49 A	5,58 A	5,55 AB
CV (%)	8,54	7,47	7,19	9,54
F	5,40**	6,20**	8,20**	5,05**

LGI-P- *Gluconacetobacter diazotrophicus*; JNFb – *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*; LGI – *Azospirillum amazonense*; JMV – *Burkholderia* sp.

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem pelo teste Tukey a 5%. * e ** representam significativo pelo teste F com $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

Verificou-se que para *Burkholderia* o efeito dos AH com bactérias em relação à população não foi positivo. Um fato que merece destaque é o estabelecimento da população de *Herbaspirillum* na presença de AH. Observa-se que logo após a inoculação, o tratamento apenas bactéria consegue se diferenciar do controle (Tabela 11). Aos 60 dias da inoculação, isso não ocorre, demonstrando que seu estabelecimento só é efetivo com AH+bactérias (Tabela 12).

4.4.2. Resultados da Cana Planta

4.4.2.1 Teores foliares de N, P, K, Ca e Mg na cana-planta

A interpretação foi realizada pelo critério de faixas de suficiência de acordo com Malavolta et al. (1997) e Raji et al. (1996) apresentadas na Tabela 13.

Tabela 13. Faixas de teores adequados (faixa de suficiência) de macro e micronutrientes para a cana-de-açúcar.

	N	P	K	Ca	Mg
			g Kg ⁻¹		
Cana-panta	19 - 21	2,0 - 2,4	11 - 13	8 - 10	2 - 3
Cana-soca	20 - 22	1,8 - 2,0	13 - 15	5 - 7	2 - 25

Fonte: Adaptado Malavolta et al. (1997) e Raji et al. (1996).

Os resultados da análise foliar da cana-planta encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Teores médios de nutrientes nas folhas da cana-de-açúcar micropropagada var NA 5679 (cana planta)

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg
			g Kg ⁻¹		
			----- 0 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----		
Controle	10,12	1,14	11,54	6,38	2,35
Bactéria	10,20	1,12	12,06	5,50	2,18
AH	9,57	1,13	12,69	5,15	2,19
Bactéria+ AH	9,50	1,20	12,38	5,70	2,34
			-----10 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----		
Controle	10,08	1,26	13,98	5,94	2,22
Bactéria	10,45	1,26	14,57	5,63	2,11
AH	10,06	1,30	15,41	5,90	2,17
Bactéria+ AH	9,67	1,29	15,41	5,01	2,07
			----- 20 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----		
Controle	9,97	1,23	11,96	6,66	2,47
Bactéria	10,12	1,18	14,47	5,20	1,80
AH	9,81	1,25	14,16	5,68	3,00
Bactéria+ AH	10,03	1,31	13,01	5,83	2,38
F	0,49ns	1,63ns	1,98ns	3,48**	1,17ns
CV%	11,22	7,68	12,50	13,36	25,45

ns, * e ** representam: não significativo, significativo pelo teste F com $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

Os tratamentos estudados não aumentaram os teores de nitrogênio nas folhas da cana-de-açúcar, conforme se verifica na Tabela 14, estando os valores abaixo da faixa considerada adequada. O acúmulo de nutrientes é influenciado por diversos fatores, dentre outros, características morfológicas e fisiológicas do sistema radicular, a aeração do solo, a disponibilidade de água e de nutrientes no solo e as condições térmicas (Vitti e Mazza, 2002; Demattê, 2005; Vasconcelos e Garcia, 2005). É importante lembrar que não é somente a FBN que promove aumento de produção. Fatores relacionados a promotores de crescimento e bactérias, como fitormônios também podem atuar no estímulo de produção, resultando em uma absorção eficiente de água e nutrientes (Mirza et al., 2001; Olivares et al, 2002).

Os teores de K variaram da faixa de suficiência até o consumo de luxo para cana-planta. Apesar de apresentar influência dos tratamentos, os teores de Ca (Tabela 15), foram classificados como deficientes quando comparados com a faixa ideal de nutrientes para cana-planta (Tabela 13). Para Casagrande (1991), a deficiência prejudica os pontos de crescimento, o desenvolvimento radicular e o vigor dos colmos.

Tabela 15. Teor médio de cálcio na folha de cana-de-açúcar em função dos tratamentos na cana planta.

Tratamentos	Ca
	g Kg ⁻¹
Controle	6,34 A
AH	5,57 AB
AH+Bactéria	5,21 AB
Bactéria	5,44 B

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna não diferem pelo teste Tukey a 5%

O tratamento controle proporcionou maiores teores de Ca na folha (16,54%) quando comparados com plantas que receberam apenas bactérias. Malavolta et al. (1989) comentaram que além do cálcio estimular o desenvolvimento das raízes, aumentar a resistência a pragas e moléstia, auxilia na FBN.

4.4.2.2 Características agroindustriais da cana-planta

Os resultados das características agroindustriais da cana-planta encontram-se na Tabela 16. Não houve diferença estatística pelo teste tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 16. Características agroindustriais da cana-de-açúcar micropropagada NA 5679 aos 16 meses após plantio (cana planta)

Tratamentos	BRIX	FIBRA	POL	PCC	PUR
%					
----- 0 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	22,43	11,26	20,05	16,82	89,41
Bactéria	22,00	11,09	19,71	16,58	89,57
AH	22,75	10,61	20,64	17,48	90,73
Bactéria+ AH	22,73	12,39	20,50	16,93	90,21
-----10 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	22,10	10,83	19,71	16,63	89,16
Bactéria	21,98	10,73	19,73	16,68	89,76
AH	22,15	11,05	19,62	16,51	88,55
Bactéria+ AH	21,90	10,27	19,36	16,47	88,42
----- 20 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	22,38	11,40	19,74	16,56	88,22
Bactéria	21,83	10,38	19,41	16,49	88,96
AH	22,20	11,52	20,00	16,72	90,07
Bactéria+ AH	22,65	11,21	20,10	16,88	88,76
F	2,52ns	0,52ns	1,79ns	1,19ns	1,12ns
CV%	2,14	10,38	19,88	0,33	1,36

Ns - representa não significativo pelo teste F com $p < 0,05$.

Um fato que merece destaque é que tanto os tratamentos como as doses de adubação orgânica não inibiram as características agroindustriais. Este resultudado pode ser promissor se aliado ao aumento de produtividade, pois conseqüentemente acarretará em aumento na produtividade de açúcar devido ao acréscimo de colmos produzidos.

4.4.3. Resultados da primeira cana-soca.

4.4.3.1. Teores foliares de N, P, K, Ca e Mg na primeira cana-soca.

Os resultados das análises foliares da primeira cana-soca encontram-se na Tabelas 17. Verificou-se efeito dos tratamentos em relação aos teores de P, K e Ca e suas médias são apresentadas na Tabela 18.

Tabela 17. Teores médios de nutrientes nas folhas da cana-de-açúcar micropropagada var NA 5679 (1ª soca)

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg
g Kg ⁻¹					
----- 0 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	10,71	1,07	7,36	7,55	2,00
Bactéria	11,31	1,13	8,20	6,66	1,91
AH	11,06	1,06	8,20	6,76	1,84
Bactéria+ AH	9,52	1,12	9,03	5,75	1,90
----- 10 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	9,60	1,04	7,46	6,82	1,48
Bactéria	10,47	1,09	8,82	6,48	1,59
AH	10,24	1,03	8,83	5,50	1,30
Bactéria+ AH	9,30	1,02	9,97	5,27	1,38
----- 20 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	9,09	0,99	5,68	7,79	2,01
Bactéria	10,82	1,14	8,51	6,70	1,76
AH	8,75	1,01	8,19	6,28	1,99
Bactéria+ AH	8,74	1,11	6,42	7,55	2,81
F	1,98ns	3,40**	4,56*	6,01**	1,20ns
CV %	14,01	7,69	16,41	12,15	24,42

ns, * e ** representam: não significativo, significativo pelo teste F com $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

Os tratamentos AH e bactérias quando aplicados isoladamente, não apresentaram diferentes teores de P, em relação ao controle. Quando aplicados em conjunto, ou seja, AH+bactéria, observou-se acréscimo (22,68%) em relação ao controle, suficiente para se diferenciar estatisticamente deste e ser classificado dentro da faixa adequada de P para cana-soca segundo Malavolta et al. (1997) e Raij et al. (1996) (Tabela 13).

Em relação ao K, todos os tratamentos foram classificados como insuficientes para cana-soca. Contudo, observou-se um potencial dos tratamentos em proporcionar acréscimo médio deste elemento de 23,86%, em relação ao controle.

Tabela 18. Teor médio de P, K e Ca na folha de cana-de-açúcar em função dos tratamentos na primeira soca.

Tratamentos	P		K		Ca
	-----g kg ⁻¹ -----				
Controle	0,97	B	6,83	B	7,38 A
Bactéria	1,02	B	8,51	A	6,61 AB
AH	1,07	AB	8,4	A	6,18 B
AH+bactéria	1,19	A	8,47	A	6,19 B

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna não diferem pelo teste Tukey a 5%

Considerando os teores de Ca, apenas o controle foi classificado como acima da faixa adequada e todos os demais tratamentos dentro desta faixa de suficiência. Os efeitos do excesso de Ca não são totalmente conhecidos devido à hipótese de haver deficiências de K e Mg Malavolta et al. (1989). Todavia, Clementes (1989), relatou que quantidades excessivas de Ca aumentam a absorção do Mg e reduzem grandemente a absorção de K. A capacidade dos tratamentos de reduzir os teores foliares de Ca também foi observada na cana-planta (Tabela 13).

4.4.3.2 Características agroindustriais da primeira cana-soca

Os resultados de análises tecnológicas da primeira cana-soca encontram-se na tabela 19.

Tabela 19. Características agroindustriais da cana-de-açúcar micropropagada NA 5679 aos 28 meses após plantio (1ª soca)

Tratamentos	BRIX	FIBRA	POL	PCC	PUR
%					
----- 0 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	20,93	10,99	18,23	15,35	87,11
Bactéria	20,58	10,84	17,66	14,90	85,81
AH	20,70	11,58	18,27	15,26	88,27
Bactéria+ AH	20,55	10,74	17,70	14,96	86,14
-----10 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	20,40	10,79	18,02	15,22	88,34
Bactéria	20,03	10,25	17,24	14,67	86,09
AH	20,15	11,29	17,72	14,87	87,96
Bactéria+ AH	20,13	10,56	17,75	15,04	88,19
----- 20 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	20,15	11,41	17,12	14,34	85,02
Bactéria	20,25	10,43	17,87	15,17	88,25
AH	20,53	11,61	18,25	15,24	88,91
Bactéria+ AH	20,50	10,98	17,82	15,01	86,88
F	0,49ns	8,40**	1,43ns	0,64ns	1,79ns
CV(%)	2,20	4,73	2,52	2,54	1,83

Ns e ** representam: não significativo, significativo pelo teste F com $p < 0,01$.

Observou-se que houve efeito significativo de tratamentos sobre FIBRA dos colmos (Tabela 20).

As menores percentagens de FIBRA foram devido aos tratamentos que levaram bactérias diazotróficas e classificadas dentro da faixa como ideais. A porcentagem de fibra na cana é uma variável agroindustrial de suma importância. Seus níveis, em uma cana normal, devem oscilar em uma faixa de 10-11%. Segundo Fernandes (2000), fibra é a matéria insolúvel em água contida na cana. No campo, a fibra está relacionada com a colheita, principalmente da cana picada, normalmente a condição de tornar os colmos eretos evitando o tombamento é na industrial, a importância devido à moagem e balanço térmico da

fábrica. A fibra também é empregada nos cálculos de determinações expressas em porcentagem de cana, como a Pol, ART, AR e demais parâmetros que definem a qualidade da cana-de-açúcar como matéria-prima.

Tabela 20. Efeito dos tratamentos com AH e bactérias diazotróficas sobre a FIBRA e POL de colmos de cana-de-açúcar no segundo corte.

Tratamentos	FIBRA
	%
Controle	11,06 AB
Bactéria	10,50 B
AH	11,49 A
AH+Bactéria	10,76 B

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna não diferem pelo teste Tukey a 5%

Franco (2003), afirma que é necessário conhecer o teor de fibra para efetuar os cálculos da capacidade de moagem de uma indústria. Na cana industrial, ou seja, na cana disposta na esteira de uma usina, por conta das impurezas que acompanham a matéria-prima (impurezas vegetais e minerais), o teor encontrado para fibra é maior, da ordem de 14-15%. Por outro lado, cana com baixos teores de fibra pode inviabilizar o balanço energético da indústria. Quando isso acontece a empresa tem que utilizar outras fontes de energia como o óleo diesel, lenha e etc. As duas situações resultam em aumentos dos custos de produção.

4.4.4 Resultados da segunda cana-soca

4.4.4.1 Teores foliares de N, P, K, Ca e Mg na segunda cana-soca.

Os resultados dos teores médios de nutrientes nas folhas de cana-de-açúcar tratadas com AH e bactérias encontram-se na Tabela 21. Nenhum elemento se diferenciou estatisticamente tanto em relação aos tratamentos como em relação às dosagens.

Tabela 21. Teores médios de nutrientes nas folhas da cana-de-açúcar micropropagada var NA 5679 (2ª soca)

Tratamentos	N	P	K	Ca	Mg
g Kg ⁻¹					
----- 0 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	12,39	1,94	9,66	5,37	1,49
Bactéria	13,98	2,00	9,66	6,59	1,86
AH	13,71	2,01	11,54	5,51	1,55
Bactéria+ AH	14,20	1,94	9,97	5,99	1,76
-----10 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	12,59	2,10	10,81	5,19	1,39
Bactéria	11,78	1,93	9,86	5,09	1,31
AH	12,27	2,19	13,33	3,82	1,56
Bactéria+ AH	14,39	1,97	12,91	5,15	1,52
----- 20 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	13,21	1,97	10,81	6,62	1,84
Bactéria	11,82	2,00	10,08	6,76	1,81
AH	11,30	1,93	10,39	6,18	1,65
Bactéria+ AH	13,28	1,89	10,21	6,37	1,78
F	0,87ns	0,71ns	1,53ns	1,40ns	0,59ns
CV %	20,59	9,49	21,05	20,06	15,62

Ns- representa: não significativo pelo teste F com $p < 0,05$.

Verificou-se que apenas os teores médios de P e de Ca estão classificados dentro da faixa adequada para cana-soca (Tabela 13), resultado que no geral, foi semelhante ao da primeira soca (Tabela 17).

4.4.4.2. Características agroindustriais da segunda cana-soca

Os resultados das características tecnológicas agroindustriais, dos colmos de cana-de-açúcar, avaliados neste trabalho encontram-se na Tabela 22.

Tabela 22. Características agroindustriais da cana-de-açúcar micropropagada NA 5679 aos 40 meses após plantio (2ª soca)

Tratamentos	BRIX	FIBRA	POL	PCC	PUR
%					
----- 0 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	19,70	10,25	16,91	14,40	85,71
Bactéria	20,25	10,42	17,67	15,01	87,71
AH	20,45	10,74	18,25	15,42	89,20
Bactéria+ AH	19,95	10,32	17,72	15,06	88,80
-----10 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	19,35	9,60	16,89	14,51	87,28
Bactéria	19,45	9,55	16,82	14,45	86,46
AH	19,60	10,57	17,31	14,67	88,34
Bactéria+ AH	19,55	10,16	17,11	14,58	88,77
----- 20 Mg vermicomposto ha ⁻¹ -----					
Controle	19,75	10,26	17,36	14,77	87,87
Bactéria	19,70	10,59	17,41	14,74	90,89
AH	20,20	10,92	18,34	14,79	88,32
Bactéria+ AH	20,25	10,22	17,95	15,28	88,62
F	2,72ns	1,19ns	2,21ns	1,94ns	2,36ns
CV(%)	2,14	9,51	3,41	3,33	3,21

Ns - representa não significativo pelo teste F com $p < 0,05$.

Observou-se que no terceiro corte (2ª soca), tanto para os tratamentos quanto para doses de vermicomposto, não houve efeito significativo nas características agroindustriais.

4.4.5. Produtividade agrícola da cana-de-açúcar

Os resultados de produtividade média agrícola das três colheitas realizadas neste experimento encontram-se na Tabela 23. No primeiro corte e na ausência de adubação orgânica, observou-se que os tratamentos apenas bactéria e somete AH, proporcionaram incrementos na ordem de 15 e 20% de produtividade em relação ao controle. Ao aplicar AH com bactérias, nota-se aumento de cerca de

32% na produtividade em relação ao controle, o suficiente para torná-los diferentes a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Tabela 23. Produtividade agrícola da cana-de-açúcar (TCH) micropropagada var. NA 56 79 tratada com três doses de vermicomposto (0, 10 e 20 Mg ha⁻¹) no sulco de plantio e aplicação *in vitro* de ácidos húmicos (20 mg C L⁻¹), bactérias diazotróficas (Inoculo Misto) e ácidos húmicos + bactérias.

	Doses de vermicomposto (Mg ha ⁻¹)		
	0	10	20
TCH (Mg ha ⁻¹)			
----- 1ª colheita: 16 meses após plantio (cana planta) -----			
Controle	100,62 B	128,25 AB	122,50 AB
Bactéria	115,95 AB	104,55 B	102,30 B
AH	120,80 AB	144,10 A	145,70 A
AH+bactéria	132,65 A	153,45 A	123,75 AB
F	4,23*	5,79**	3,98*
CV (%)	14,28		
----- 2ª colheita: 28 meses após plantio (1ª soca) -----			
Controle	75,46	85,25 B	84,58 AB
Bactéria	79,21	78,78 B	73,50 B
AH	82,86	101,43 A	91,50 A
AH+bactéria	79,86	95,14 A	71,61 B
F	0,51 ^{ns}	5,68**	4,94**
CV (%)	10,17		
----- 3ª colheita: 40 meses após plantio (2ª soca) -----			
Controle	76,55	83,04	80,93
Bactéria	80,53	81,95	67,53
AH	75,03	96,28	76,46
AH+bactéria	83,36	85,46	70,32
F	0,56 ^{ns}	1,70 ^{ns}	1,44 ^{ns}
CV (%)	12,62		

Médias de mesma colheita, seguidas de mesma letra maiúscula na coluna, não diferem pelo teste Tukey (5%). ns, * e ** representam: não significativo, significativo pelo teste F com $p < 0,05$ e $p < 0,01$.

Em relação as plantas que receberam 10 Mg ha⁻¹ de vermicomposto no sulco de plantio, os melhores tratamentos foram aqueles constituídos de AH

representando 12,35 e 19,65% de aumento para AH e AH+bactéria em relação ao controle. Para a maior dosagem (20 Mg ha⁻¹), o maior resultado foi devido ao tratamento com AH, cerca de 19,42% de incremento em relação ao controle.

Ao analisar os dados é possível observar que a presença da adubação orgânica influencia no potencial das bactérias diazotróficas endofíticas em proporcionar aumento de produtividade de cana-de-açúcar. Uma hipótese para este fato é a competição estabelecida entre as bactérias estudadas com a população de microrganismos presentes ou estimulada pelo composto orgânico. Este fato também é observado na segunda colheita, que apresenta efeito dos tratamentos em relação a doses de vermicomposto.

Em referência à primeira rebrota, houve efeito residual dos tratamentos na presença de adubação orgânica. Na dose de 10 Mg ha⁻¹, os melhores resultados foram devido aos tratamentos com AH e AH+bactérias com 18,97 e 11,60% de aumento de produtividade.

Para verificar se os efeitos dos tratamentos permaneceriam na segunda rebrota, foi realizada a terceira colheita (2ª soca) aos 40 meses após o plantio. Contudo, como não houve resultados significativos, constatou-se que após o segundo corte (1ª soca) é necessário realizar outra aplicação dos tratamentos.

Os resultados permitiram averiguar que a aplicação in vitro de AH e bactérias diazotróficas endofíticas em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar é eficiente e quando adicionado vermicomposto (10Mg ha⁻¹) no sulco de plantio há efeito residual no segundo corte.

O uso de AH e bactérias diazotróficas no manejo de cana-de-açúcar representa um potencial para o desenvolvimento de um insumo biológico para a produção vegetal.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Um dos maiores desafios hoje é o de buscar alternativas para a produção agrícola sustentada, ou seja, desenvolver um processo continuado de mudanças na base tecnológica, no qual a exploração dos recursos, a orientação dos investimentos e do desenvolvimento tecnológico esteja de acordo com as necessidades atuais de produção segundo novos padrões, sem comprometer as possibilidades de atendê-las no futuro.

A hipótese deste trabalho foi a de que é possível combinar o efeito de promoção do crescimento radicular característico das SH com a inoculação de estirpes selecionadas de bactérias diazotróficas com vias a obtenção de magnitudes de respostas superiores à aplicação isolada, visando a geração de um insumo agroecológico capaz de otimizar a produção em bases sustentadas. Para atender o objetivo proposto nesse trabalho foi instalada uma seqüência de experimentos de campo.

Os ensaios que compõem esse trabalho tiveram o objetivo específico de avaliar:

- O efeito da aplicação foliar de AH isolados de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HIII 206 em diferentes épocas de aplicação na cultura do milho;
- A influência da aplicação foliar de AH isolados de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HIII 206 com adubação nitrogenada na produtividade do milho;
- A aplicação foliar de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 em cana-de-açúcar;

- O efeito de AH isolados de vermicomposto e inóculo misto sobre cana-de-açúcar micropropagada na fase de aclimatização e em condições de campo.

A partir dos resultados obtidos concluiu-se que:

- O uso de AH e de AH com bactérias diazotróficas via pulverização foliar no milho é dependente da época de aplicação. As melhores produtividades foram atingidas com a utilização de AH com bactérias endofíticas. As respostas da aplicação foliar de *Herbaspirillum seropedicae* são eficientes e ocorrem mesmo se aplicadas no segundo estágio fenológico do milho.

- A aplicação foliar de AH extraídos de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* HIII 206 com adubação nitrogenada é eficiente e promoveu aumento de até 83% na produtividade de grãos do milho DKB 789.

- A cana-de-açúcar RB 867515 respondeu a aplicação foliar de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 com aumento de produtividade em cerca de 23% em relação ao controle.

- A aplicação in vitro do uso combinado de ácidos húmicos extraídos de vermicomposto e inóculo misto em mudas micropropagadas de cana-de-açúcar var NA 5679 é eficiente e quando adicionado vermicomposto (10Mg ha^{-1}) no sulco de plantio há efeito residual na primeira rebrota. Após o segundo corte há necessidade de reaplicação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre Jr, J.M. 1936. Creação de novas variedades de canna no Estado de S. Paulo. Boletim Technico nº 34. Instituto Agrônômico do Estado em Campinas, Campinas. 64p.
- Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. v. 163, p. 173 – 181.
- Albuquerque, G. A. C. & Marinho, M. L. Efeito residual de fósforo em cana-de-açúcar nos Tabuleiros de Alagoas. In: CONGRESSO NACIONAL DA SOCIEDADE DOS TÉCNICOS AÇUCAREIROS E ALCOOLEIROS DO BRASIL, 3. , 1984. São Paulo. Anais São Paulo: STAB, 1984. p. 153-159.
- Almendros, G., Dourado, J. (1999) Molecular characteristics relates to the biodegradability of humic acids preparation. *European Journal of Soil Science* 50:227-236.
- Altieri, M., (2002) A evolução do pensamento agroecológico. In: Altieri, M. (ed.) *Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável*. Guaíba: Agropecuária p. 21-51.

- Andrade, J. C. (1985). Esborço histórico de antigas variedades de cana-de-açúcar. ASPLANA, Maceio, Alagoas. 285 pp.
- Asflucan, (2009). Produtividade média da cana-de-açúcar na Região Norte Noroeste Fluminense. Disponível em: www.brasileagricolabr/jhdpgalcana.com.br/pdf/156/%5Cpsodtw. Acesso em: 15 dez. 2009.
- Bacchi, O. O. S. (1983). Botânica da cana-de-açúcar. In: ORLANDO FILHO, J. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil. Instituto do Álcool e do Açúcar/Planalsucar. Piracicaba. p. 25-37.
- Baldani, J. I. (1984). Ocorrência e caracterização de *Azospirillum amazonense* em comparação com as outras espécies deste gênero, em raízes de milho, sorgo e arroz. Itaguaí-RJ, UFRRJ, Tese de Mestrado. 110 pp.
- Baldani, J. I. e Baldani, V. L. D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in gramineaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 77, n. 3, p. 549 – 579.
- Baldani, J. I., Caruso, L., Baldani, V. L. D., Goi, S. R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology & Biochemistry* 29:911-922.
- Baldani, J. I., Reis, V. M., Baldani, V. L. D., Döbereiner, J. (2002) A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. *Funct. Plant Biol.* 29:417-423.
- Baldani, J. I.; Baldani, v. L. D.; Seldin, I.; Döbereiner, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen - fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Reading, UK, v.36, n.1, p 86-93, 1986.

- Baldani, J.I., Baldani, V.L.D., Seldin, L., Döbereiner, J. (1996) Inclusion of "*Pseudomonas*" *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, within *Herbaspirillum*. *International Systematic Bacteriology* 36: 802-810.
- Baldani, V. L. D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* sp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica, RJ, 1996. 234 p. Tese. (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Baldani, V.L.D., Baldani, J.I., Olivares, F.L., Döbereiner, J. (1992) Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 13: 65-73.
- Baldotto, L. E. B.; Baldotto, M. A.; Giro, V. B. ; Canellas, L. P.; Olivares, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. E. Desempenho do abacaxizeiro vitória em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* (Impresso), v. 33, p. 979-990, 2009.
- Balota, E. L. (1994). Interação de bactérias diazotróficas e fungos micorrízicos arbusculares na cultura da mandioca (*Manihot sculenta* Crantz). Itaguaí-RJ, UFRRJ. Tese de Doutorado, 281 pp.
- Bar-Ness, E.; Hadar, Y.; Shanzer, A.; Libman, J. (1992). Iron uptake by plants from microbial siderophores. A study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. *Plant Physiology*. v. 99, p. 1329 – 1335.
- Bashan, Y., (1990a) Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux in intact wheat roots. *Can J. Bot.* 36: 419-425.
- Bashan, Y., Levanony, H. (1990b) Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology* 36: 591-608.

- Bashan, YOAV. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. v. 16, n. 4, p. 729 – 770.
- Bastian, F.; Rapparini, F.; Baraldi, R.; Piccoli, P.; Bottini, R. (1998) Inoculation with *Acatobacter diazotrophicus* increases glucose and fructose content in shoots of sorghum bicolor (L.) Moench. *Symbiosis*, Rehovot, 27:147-156.
- Bellone, C. H.; Bellone, D. V. C.; Pedraza, R. O.; Monzon, M. A. (1997). Cell colonization and infection thread formation in sugar cane roots by *Acetobacter diazotrophicus*. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 29, n. 56, p. 965 - 967.
- Benizri, E., Courtade, A., Picard, C., Guckert, A. (1998) Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1481-1484.
- Benjamin, C. (1993) Diálogos sobre ecologia, ciência e política: Fórum de ciência e cultura da UFRJ. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 198p.
- Boddey, L. H. (2002). Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*, isoladas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) cultivadas na Austrália e no Brasil. 109 f. Tese (Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- Boddey, L. H.; Dart, P.; Goi, S. R.; Baldani, J. I. Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas no cultivar Q151 de cana-de-açúcar cultivada na Austrália. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. Resumos... Caxambu, MG: UFLA; SBCS; SBM, 1998.
- Boddey, R. M. (1987) Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. *Critical Review in Plant Science* 6:209-266.

- Boddey, R. M., Alves, B. J. R., Urquiaga, S. (1994) Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada à plantas utilizando o isótopo ^{15}N . In: Hungria, M., Araújo, R. S. Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola, (eds.) Embrapa-CNPAF, p. 471-494.
- Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Alves, B. J. R.; Reis, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugar cane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, The Hague, NL, v. 252, p. n.1, 139-149, may. 2003.
- Boddey, R.M. (1995) Biological nitrogen fixation in sugar cane: A key to energetically viable biofuel production. *Critical Review in Plant Science* 14: 263-279.
- Brasil, M. DA S. (2005). Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz. Tese de Doutorado - Instituto de Agronomia, UFRRJ, Seropédica, 137p.
- Brasil, M. S. Ocorrência e diversidade genética de bactérias diazotróficas endofíticas em diferentes variedades de arroz . Seropédica, RJ, 2005. 137 p. Tese. (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Balanço nacional da cana-de-açúcar e da agroenergia. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERA/PDF. Acesso em: 15 out. 2008. Agricultura. Links: Cana-de-açúcar e agroenergia: estatística.
- Burris, R. H. (1975) The acetylene reduction technique. In: Nitrogen Fixation by Free-Living Microorganisms. D. P. Stewart (eds.) International Biological Programme., New York: Cambridge Univ. Press, 6:249-258.
- Caballero-Mellado, J.; Martinez-Aguilar, L.; Paredes-Valdez, G.; Estrada de Los Santos, P. (2004). *Burkholderia unamae* sp. nov., in N₂- fixing rhizospheric

and endophy species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 54, p. 1165 - 1172.

Cadernos Tecnológicos. (2004). Produtor de cana-de-açúcar. Instituto Centro de Ensino Tecnológico. Fortaleza, 2ª ed., 64 p.

Cadernos Tecnológicos. (2004). Produtor de cana-de-açúcar. Instituto Centro de Ensino Tecnológico. Fortaleza, 2ª ed., 64 p.

Caldas, C. Manual de análises selecionadas para indústrias sucroalcooleiras. Maceió: Sindicato da Indústria do Açúcar e do Alcool do Estado de Alagoas. 422p.

Camargo, F.A.O., Gianello, C., Tedesco, M.J., Vidor, C. (1999) Nitrogênio orgânico do solo. *In: Santos, G.A., Camargo, F.A.O. (eds) Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre: Gênese, p.117-133.

Canellas, L. P., Piccolo, A.; Dobbss, L. B.; Spaccini, R.; Olivares, F. L.; Zandonadi, D. B. ; Façanha, A. R. (2010). Chemical composition and bioactivity properties of size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere* (Oxford), v. 78, p. 457-466,

Canellas, L.P., Araújo, G.S. (2005) *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes-RJ: Canellas & Santos Ed., 309p.

Canellas, L.P., Olivares, F.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha A.R. (2002) Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiology* 130: 1951-1957.

- Canuto, E. L.; Oliveira, A. L. M. e Baldani, J. I. (2000) Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Anais da X Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ. 10:57-58.
- Canuto, E. L.; Oliveira, A. L. M.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. (2003). Evaluation of the biological nitrogen fixation contribution in sugarcane plants originated from seeds and inoculated with nitrogen-fixing endophytes. Brazilian Journal of Microbiology. v. 34, suplementos 2, p. 62 - 64.
- Canuto, E. L.; Oliveira, A. M.; Baldani, J. I. (2000). Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. Resumo. Anais da X Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ. v. 10, p. 57 - 58.
- Canuto, E. L.; Oliveira. (2008). Metodologias de inoculação e prospecção de compostos secretados por bactérias diazotróficas endofíticas na promoção de crescimento de plantas de cana-de-açúcar. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 133p.
- Canuto, E. L.; Salles, J. F.; Oliveira, A. L. M.; Perin, L.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. (2003). Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas. Agronomia. v. 37, n. 2, p. 67 – 72.
- Carneiro JR, J. de B. (2006). Efeito do tratamento térmico e da inoculação de bactérias endofíticas no controle do raquitismo da soqueira da cana-de-açúcar. Tese Doutorado. UENF – Campos dos Goytacazes, 92p.
- Casagrande, A. A.; Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar. Jaboticabal, FUNEP, 1991, 157p.
- Cavalcante, V. A., Dobereiner, J. (1988) A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108:23-31.

- Chen, J., Gu, B., Royer, R.A., Burgos, W.D. (2003) The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron. *The Science of the Total Environment* 307: 167-178.
- Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M. (1977) Information provided on humic substances by E₄/E₆ ratios. *J. Soil Sci. Soc. Am.* 41: 352-358.
- Chen, Y.; Aviad, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy, P., Clapp, C.E., Malcom, R.L., Bloom, P.R. (Eds.), *Humic Substances in Soils and Crop Science: Selected Readings*, Madison, *Soil Science Society of America* p.161-1186.
- Clements, H.F. (1980) *Sugarcane crop logging and control: Principles and Practices*. The University Press of Hawaii. Pitman Publishing LTDA.
- Conceição, P. M.; Vieira, H. D. ; Canellas, L. P.; Marques JR, R. B. ; OLIVARES, F. L. (2008). Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (Online) v. 43, p. 545-548.
- Cosgrove, D.J. (1998) Cell Wall Loosening by expansins, *Plant Physiology* 118: 333-339.
- Cruz, L. M.; Souza, E. M.; Weber, O. B.; Baldani, J. I.; Dobereiner, J.; Pedrosa, F. O. 16S ribossomal DNA characterization of nitrogen- fixing bacterial isolated from banana (*Musa* spp.) e abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, DC, v. 67, n. 5, p. 2375 – 2379, 2001.
- Cunha, T.J.F. (2005) *Ácidos húmicos de solos escuros da Amazônia*. (Tese de Doutorado) – Seropédica-RJ, UFRRJ, 140p.
- Daniels, J; Roach, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D. J . *Sugarcane improvement through breeding*. New York: Elsevier, 1987. 84p.

- Dantas, B. e Melo, J.L. 1960. A situação das variedades na zona canavieira de Pernambuco (1954/55 a 1957/58) e uma nota histórica sobre as variedades antigas. Boletim Técnico nº 11. p. 29-82. Instituto Agrônomo do Nordeste, Recife.
- Dari, K., Béchet, M., Blondeau, R. (1995) Isolation of soil *Streptomyces* strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. *Microbiology Ecology* 16:115-122.
- De Michaelis, M.I., Spanswick, R.M. (1986) H⁺ -pumping driven by the vanadate-sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. *Plant Physiology* 81: 542-547.
- Deerr, N. 1921. Cane Sugar. 2nd ed. Norman Rodger, London. 644p.
- Dekhil, S. B.; Cahill, M.; Stackbrandt, E.; SLY, L. I. (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum lagomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subs. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*. v. 20, p. 72 - 77.
- Deuber, R. Maturação da cana-de-açúcar na região Sudeste do Brasil. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 4, 1988, Piracicaba. Anais.... Piracicaba: Copersucar, 1988. p. 33-40.
- Deuner, S.; Nascimento, R.; Ferreira, L. S.; Badinelli, P. G.; Kerber, R. S. A. Adubação foliar e via solo nitrogênio em plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 32, n. 5, p. 1359-1365, 2008.
- Döbereiner, J. (1992). History and new perspective of diazotrophs in association with non-leguminous plants, *Symbiosis*. v. 13, p. 1 - 13.

- Döbereiner, J. (1997) Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. *Soil Biology & Biochemistry* 29: 771-774.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA-SPI: Itaguaí-RJ. EMBRAPA-CNPAB, 60p.
- Döbereiner, J., DAY, J. M. (1975) Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: International Symposium on Nitrogen Fixation. Pullman Proceedings Washington, Washington State University, 1:518-538.
- Döbereiner, J., Ruschel, A. P. (1958) Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *R. Biol. São Paulo* 1: p. 261-272.
- Dong, Z.; Canny, M. J.; Mccully, M. E.; Roboredo, M. R.; Cabadilla. C. F.; Ortega, E.; Rodés, R. (1994). A nitrogen-fixing endophytic of sugar cane stems: a new role for the apoplast. *Plant Physiology*. v. 105, p. 1139 - 1147.
- Eckert, B.; Weber, O. B.; Kirchof, G.; HALBRITEER, A.; Stoffels, M.; Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 17-26.
- Edgerton, C.W. 1955. Sugarcane and its diseases. Louisiana State University Press, Baton Rouge. 290p.
- Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Solo (Rio de Janeiro, RJ). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro, 1999, 412p.
- Enyedi, A. J.; Yalpani, N.; Silverman, P.; Raskin, I. (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *The Cell*. v. 70, p. 879 – 886.

- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil F., Schripsema, J., Braz-filho, R., Oliveira, M.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37:1301-1310.
- Fancelli, A.L. & D. Dourado-Neto. Produção de Milho. Ed. Agropecuária, Guaíba. 360 p., 2000.
- Fancelli, A.L. & D. Dourado-Neto. Tecnologia da produção de milho. ESALQ/USP, Departamento de Agricultura, Piracicaba. 174p., 1997.
- Fancelli, A.L. Plantas Alimentícias: guia para aula, estudos e discussão. Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz". ESALQ/USP, 1986. 131p.
- Fein, J.B., Boily, J., Guçlu, K., Kaulbach, E. (1999) Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces. *Chemical Geology* 162:33-45.
- Fernandes, A. C. Cálculos na Agroindústria da cana de açúcar. Piracicaba, STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, 2000, 193p.
- Fernandes, A C. Autorização da colheita da cana-de-açúcar. In: SEMANA DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA "JAIME ROCHA DE ALMEIDA", 4, 1985, Piracicaba. Anais... . Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 1985. p. 12-21.
- Fernandes, A.C. Cálculos na Agroindústria da cana-de-açúcar. 2. ed. Piracicaba: STAB, 2003. 240 p.
- Fernandes, A.C. Refratômetro de campo. In: Boletim Técnico Copersucar, v. 19, p. 5-12, 1982.

- Ferrara, G.; Brunetti, G. Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of Table grape cv. Itália. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, v.42, p.79-87, 2008.
- Ferreira, A. C.; Cozzolino, K.; Carvalho, A. R. V.; Döbereiner, J. Isolation and characterization of Diazotrophic bacteria in oil palm trees. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS, 1995, Angra dos Reis. The role of biological nitrogen fixation proceedings. Angra dos Reis, RJ: Embrapa-CNPAB, 1995.
- Figueiredo, P. A. M. Particularidades a respeito do Potássio. STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, Piracicaba, vol. 24, n. 6, 2006.
- Filip, Z., Kubát, J. (2001) Microbial utilization and transformation of humic substances extracted from soils of long-term field experiments. *Eur. J. Soil Biol.* 37: 167-174.
- Fiske, C.F., Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375.
- Franco, A. Cana-de-açúcar cultivada em solo adubado com lodo de esgoto e vinhaça: nitrogênio no sistema solo-planta, produtividade e características tecnológicas. 2003. 90p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- Franco, A. A., Döbereiner, J. (1994) A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. *Summa Phytopathologica* 20:68-74.
- Frias, I., Caldeira, M.T., Perez, C.J.R., Navarro, A.J.P., Cullianez, M.F.A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H⁺-ATPase: Characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell* 8:533-1544.

- Fuentes-Ramírez, L. E.; Bustillos-Cristales, R.; Tapia-Hernández, A.; Jiménez-Salgado, T.; Wang, E. T.; Martínez-Romero, E.; Caballero-Mellado, J. (2001). Novel nitrogen-fixing acetic acid bacteria, *Gluconacetobacter johannae* sp. nov. and *Gluconacetobacter azotocaptans* sp. nov. associated with coffee plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 1305 - 1314.
- Fuentes-Ramirez, L. E.; Jimenes-Salgado, T.; Abarca-Ocampo, I. R., Caballeiro-Mellado, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of México. *Plant and Soil*, Dordrecht, 154:145-150, 1993.
- Garcia-Mina, J.M. (2005) Technical and commercial questions associated with the use of humic substances in European Mediterranean countries. *VI Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas*, Rio de Janeiro: Embrapa-CNPS, UFRRJ, UENF, PUC, p.24-27.
- Geran, Brasil. 1971. Programa regional de pesquisas canavieiras. Grupo Especial para Racionalização da Agroindústria Canavieira do Nordeste, Ministério do Interior. Recife. 56p.
- Gillis, M.; Dobereiner, J.; Pot, B.; Goor, M.; Falsen, E.; Hoste, B.; Reinhold, B.; Kersters, K. (1991). Taxonomic relationships between (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, some clinical isolates (ef group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) *autrophicum*. Abstract In: nitrogen fixation (M, POLSINELLI, R; MATERASSI AND M. VICENZI, EDS), kluwer academic publishers. p. 292 - 294.
- Glick, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal Microbiology*, Ottawa, CA v. 41, n.2, p. 109-117, fev.1995.
- Glick, B. R.; Patten, C. L.; Holguim, G. Penrose, D. M. (1999). Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press. Waterloo, Ontario, Canada, 267p.

- Gliessman, R. (2000) *Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável*. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS, 653p.
- Govindarajan, M.; Kwon, S.W.; Weon, H.Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.23, p.997-1006, 2007.
- Gravois, K.A.; Milligan, S.B. Genetic relationship between fiber and sugarcane yield components. *CropScience*, Madison, v. 32, p. 62-7, 1992.
- Guerra, J.C.M.; Santos, G. de A.; Silva, L.S. da; Camargo, F.A.O. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G. de A. (Ed.). *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p.19-26.
- Hendre, R.R., Iyor, R.S., Kotwalm, M., Kluspe, S.S., Mascarenhas, A.F. (1983) Rapid multiplication of sugar cane by tissue culture. *Sugar cane* 1: 5-8.
- Hurek, T., Reinhold-Hurek, B.; Van Montagu, M.; Kellenberg, E. (1994) Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. *J. Bacteriol.* 176:1913-1923
- IBGE (2009). IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200902_1.shtm> Acesso em: 23 mar.2009.
- IBGE (2008). Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp?o=20&i=P>. Acesso em: 11/02/2008.

- Islam, N., Bora, L. C. (1998). Biological management of bacterial leaf blight of rice (*Oryza sativa*) with plant growth promoting rhizobacteria. *Indian Journal of Agricultural Science*. v. 68, p. 798 – 800.
- Jain, D.K., Patriquin, D.G. (1985) Characterization of a substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat roots hairs. *Canadian Journal of Microbiology* 31: 206-210.
- James, E. K., Olivares, F. L. (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17:77-119.
- James, E. K., Reis, V. M., Olivares, F. L., Baldani, J. I., Döbereinner, J. (1994). Infection of sugar cane by the nitrogen fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*. v. 45, p. 757 – 766.
- Jornalcana (2009). Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br>>. Acesso em: 26 jun. 2009.
- Kennedy, I. R.; Choudhury, A. T. M. A.; Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*. v. 36, p. 1229 – 1244.
- Kennedy, I. R.; Tchan, Y., Biological Nitrogen Fixation In: Non Leguminous Field Crops: Recent Advances. *Plant and Soil*, The Hague, NL, v.141, n.1-2, p.93–118. mar. 1992.
- Khammas, K.M., Ageron, E., Grimont, P. A. D.; Kaiser, P. (1989). *Azospirillum irakense* sp.nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology*. v. 140, p. 679 - 693.
- Kirchhof, G.; Eckert, B.; Stoffels, M.; Baldani, J. I.; Reis, V. M.; Hartmann, A. (2001). *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing a bacterial

species that occurs in C4-fibre plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 51, p. 157 - 168.

Kloepper, J. W.; Quad-Hallmann, A.; Mahaffee, W. F.; Hallmann, J. (1997). Recent studies on the microbial ecology of bacteria endophytes in plants. In: Congresso Brasileiro de Ciência do solo, 26. Rio de Janeiro, 1997. Resumos. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, CD-ROM Kloopper, 1997.

Kononova, M.M. (1982) *Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona: Oikos-Tau, 365p.

Kononova, M.M. (1966) *Soil organic matter*. Pergamon Press.

Lewin, H., Ribeiro, A.P.A., Silva, L.S. (2005) *Uma nova abordagem da questão da terra no Brasil: o caso do MST em Campos dos Goytacazes*. Rio de Janeiro: 7Letras, 167p.

Li, R. O.; Macrae, I. C. (1991). Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry*. v. 24, p. 413 - 419.

Lima, K. B>, Boddey, L. H., Rabelo, W. S., Olivares, F. O. Seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à Promoção de crescimento de mudas de mamoeiro. Disponível em: http://www.fundagres.org.br/eventos/cd_papaya2009/arquivos/11_Sementes_Mudas/kblima_arquivo1.pdf. Acesso em: 12. Dez. 2009.

Lin, W., Okon, Y., Hardy, R.W.F., (1983) Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Applied Environmental Microbiology* 45: 1775-1779.

Lopes, G.H. Glossário de termos técnicos para a indústria sucroalcooleira. Piracicaba: IAA/PLANALSUCAR, 1986. 32 p.

- Macedo, I.M. (2000) Energy production from biomass sustainability: The sugar cane agro-industry in Brazil. In: Miranda E.M. ed., *Transition to global sustainability: The contribution of Brazilian science*. Rio de Janeiro: p. 119-127.
- Machado, A.T.; Magalhães, J.R. Melhoramento de milho para uso eficiente de nitrogênio sob condições de estresse. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE ESTRESSE AMBIENTAL: O milho em perspectiva. 1992, Belo Horizonte. Anais... Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. p.321-342.
- Machado, A.T.; Magnavaca, R. Estresse ambiental: o milho em perspectiva. Rio de Janeiro : Assessoria em Projetos de Tecnologias Alternativas, 1991. 47p.
- Magalhães, P.C.; E. Paiva. 1993. Fisiologia da produção. In: Cruz, J.C., Monteiro, J.A. D.P.Santana; .J.C. Garcia; F.G.F.T.C. Bahia; L.M.A SANS & I.A. Pereira Filho. *Recomendações Técnicas para o Cultivo do Milho*. Brasília: EMBRAPA. p.85-95.
- Malavolta, E. *Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar*. São Paulo: Ultrafertil, 1982. 80p.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. *Avaliação do estado nutricional das plantas*. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. 201p.
- Marques Jr, R. B.; Canellas, L. P.; Silva, L. G.; Olivares, F. L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v.32, p.1121-1128, 2008.
- Martinez, H.E.P.; Carvalho, J.G. de.; Souza, R.B. de. *DIAGNOSE FOLIAR*. IN: Ribeiro, A.C.; Guimarães, P.T.G.; Alvarez, V.V.H. (Ed.) *Recomendação para*

uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5 Aproximação. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. p.143-168.

Matsuoka, S e Arizono, H. 1987. Avaliação de variedades pela capacidade de produção de biomassa e pelo valor energético. Anais Cong. Nac. STAB, 4: 220-225.

Matsuoka, S. 1988. O programa de variedades de cana-de-açúcar do PLANALSUCAR. Brasil açúcar., 106(1):3-10.

Matsuoka, S.; Garcia, A. A. F.; Arizono, H. . Melhoramento da Cana-de-açúcar. In: A Borém. (Org.). Melhoramento de Espécies Cultivadas. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999, v. 1, p. 205-252.

Matsuoka, S.; Garcia, A. A. F.; Calheiros, G.C. . Hibridação em Cana-de-açúcar. In: A Borém. (Org.). Hibridação Artificial de Plantas. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999b, v. II, p. 221-256.

Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J., Bally, R., Normand, P., Malik, K.A. (2001) Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant and Soil* 237: 47-54.

Moraes, V. A DE & Tauk-Tornisielo, S. M. (1997). Efeito da inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) variedade SP 70-1143, a partir de cultura de meristemas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro, SBM. p. 215.

Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 473-497.

Muthukumarasamy, R.; Revathi, G.; Lakshminarasimhan, C. (1999). Influence of N fertilization on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum*

- spp. from Indian sugarcane varieties. *Biology and Fertility of Soils*. v. 29, p. 157 – 164.
- Muthukumarasamy, R.; Revathi, G.; Loganathan, P. (2002). Effect of inorganic N on the population, in vitro colonization and morphology of *Acetobacter diazotrophicus* (syn *Gluconacetobacter diazotrophicus*). *Plant and Soil*. v. 243, p. 91 – 102.
- Nardi, S.; Pizzeghello, D.; Muscolo, A.; Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. & Biochem.* 34: 1527-1536.
- Nejad, P.; Johnson, P. A. (2000). Entophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oil seed rape and tomato. *Biological Control*. v. 18, p. 208 – 215.
- Neves, D.P. (2004) *Do Imbé, Novos horizontes: processo de construção de um assentamento rural*. Niterói: Intertexto, 160p.
- Olivares, F. L.; Baldani, V. L. D., Reis, V. M.; Baldani, J. I.; Döbereiner, J. (1996). Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. *Biology and Fertility of Soils*. v. 21, p. 197 - 200.
- Olivares, F.L. (1997) *Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (Saccharum sp. Híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero Herbaspirillum*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Seropédica – RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, 328p.
- Olivares, F.L., Ferreira F.P., Silva, L.G., Façanha, A.R., Ramos, A.C., Netto, A.T., Campostrini, E., Reis, V.M., Miguens, F.C. (2002) Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. In: 9th international symposium on nitrogen

fixation with non-legumes, Leuven: Book of Abstracts of 9th International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-Legumes, p. 38-38.

Olivares, F.L., Reis, V.M., Façanha, A.R., Baldani, J.I., Baldani, V.L., Ferreira, F.P., Batista, Q.R., Barreto, B.R., Silva, L. G., Azevedo, I.G., Brasil, F. C., Rossiello, R.O.P., Miguens, F.C., James, E.K. (2001) The role of endophytic diazotrophs in sugarcane root morphogenesis and development. 13th *International N₂ Fixation Congress*, Nitrogen Fixation-Global Perspectives, 13, Hamilton: Oxford CABI Publishing, p. 471-471.

Oliveira, A. L. M.; Canuto, E. L.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. (2003). Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 34, p. 59 – 61.

Oliveira, A. L. M.; Canuto, E. L.; Silva, E. E.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. (2004). Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 35, p. 295 – 299.

Oliveira, A. L. M.; Canuto, E. L.; Urquiaga, S.; Reis, V. M.; Baldani, J. I. (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant and Soil*, v. 284, n.1-2, p.23 - 32.

Oliveira, A. L. M.; Urquiaga, S.; Dobereiner, J.; Baldani, J. I. (2002). The effect of inoculating endophytic N₂ -fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil*. v. 242, p. 205 - 215.

Oliveira, E. (1992). Estudo de associação entre bactérias diazotróficas e arroz. Dissertação de Mestrado, UFRRJ, Itaguaí-RJ, 96p.

Orlando Filho, J. Nutrição da cana-de-açúcar. In: Andreson D.L. e Bowen, J.E. . In: FLORIDA AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION JORNAL SERIES, R-00693. Potafos, Piracicaba-SP, 1992. 40p.

- Orlando Filho, J.; Rossetto, R.; Casagrande, A.A. Micronutrientes para a cana-de-açúcar. In: FERREIRA, M. E. et al. (Ed.). Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. São Paulo: Ed. Legis Summa, vol. 1, 2001. p. 355-373.
- Patriquin, D.G., Döbereiner, J., Jain, D.K. (1983) Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Canadian Journal of Microbiology* 29: 900-915.
- Perin, L. (2003). Ecologia e diversidade de isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* associados à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) Dissertação de Mestrado - Ciências do Solo – UFRRJ. Seropédica, 68 f.
- Perin, L. (2007). Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* em associação com cana-de-açúcar e descrição de *Burkholderia silvatlantica*. Tese de Doutorado – Ciência do Solo – UFRRJ. Seropédica, 103p.
- Perin, L.; Martinez-Aguilar, L.; Paredes-Valdez, G.; Baldani, J. I. Estrada-de Los Santos, P.; Reis V. M.; Caballero-Mellado, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov. a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Reading, UK, v.56, p.1931–1937, 2006.
- Piccolo, A. (1997) New Insights on the conformational structure of humic substances as revealed by size exclusion chromatography. In: Drozd, J.; Gonet, S.S.; Senesi, N.; Weber, J. (eds) *The role of humic substances in the ecosystems and in environmental protection*. Wroclaw, Polish Chapter of IHSS, p.19-36.
- Piccolo, A. (2002) The Supramolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science. *Adv. Agron.* 75: 57-134.

- Piccolo, A.; Conte, P.; Spaccini, R.; Chiarella, M. (2003) Effects of some dicarboxylic acids on the association of dissolved humic substances. *Biol. Fert. Soils* 37: 255-259.
- Piccolo, A.; Conte, P.; Trivellone, E.; Van Lagen, B.; Buurman, P. (2002) Reduced heterogeneity of a lignite humic acid by preparative HPSEC following interaction with an organic acid. Characterization of size-separates by Pyr-GC-MS and H-1-NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 36:76-84.
- Piñón, D.; Casa, M.; Blanch, M.; Fontaniella, B.; Blanco, Y.; Vicente, C.; Solas, M. T.; Legaz, M. E. (2002). Gluconacetobacter diazotrophicus, a sugarcane endosymbiont produces bacteriocin against Xanthomonas albilineans, a sugarcane pathogen. *Research in Microbiology.* v. 153, p. 345 – 351.
- Pinto, E. DE S. L. (1965). Cana-de-açúcar. Estudos Brasileiros n. 22. Serviço de Informação Agrícola-Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, p. 50.
- Pinton, R.; Cesco, S.; SANTI, S.; Agnolon, F.; Varanini, Z. (1999) Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant Soil* 210:145–157.
- Pochon, J, e Tardieux, P. (1962). Techniques D'Analyse en Microbiologie du Soil. St. Mandé (Seine): Editions de la Tourelle, 105 p.
- Polidoro, J. C. (2001). O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica do nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar. Seropédica-RJ, UFRRJ, 185 pp. Tese de Doutorado.
- Quadt-Hallmann, A.; BENHAMOU, N.; Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. *Canadian Journal of Microbiology.* v. 43, p. 577 – 582.
- Quaggiotti S., Ruperti B., Pizzeghello D., Francioso O., Tugnoli V., Nardi S. (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and

- expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.* 55:803-813.
- Radwan, T., Mohamed, Z.K., Reis, V.M. (2002) Production of indole-3-acetic acid by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis* 32: 39-53.
- Raij, B.V.; Cantarella, H.; Quaggio, J.A.; Furlani, A.M.C. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2. ed. Campinas: IAC, 1996. 285 p.
- Raven, P. H., Ray, F. E., Eichhorn, S. E. (2001) *Biology of plants*. 6ed. New York, W. H. Freeman and Company Worth Publishers, 944p.
- Rayle D.L., Cleland R. (1972) In-vitro acid-growth response-relation to in-vivo growth responses and auxin action. *Planta* 104:282-296.
- Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T. (1998). Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Critical Reviews in Plant Sciences*. v. 17, n. 1, p. 29 - 54.
- Reis, V. M.; BALDANI, J. I.; Baldani, V. L. D.; Dobereiner, J. (2000). Biological Dinitrogen Fixation in Gramineae and Palm trees. *Critical Reviews in Plant Science*. v.19, p. 227 - 247.
- Reis, V. M.; Estrada De Los Santos, P.; Tenorio-Salgado, S.; Volgel, J.; Stroffels, M.; Guyon, S.; mavingui, p.; baldani, V. L. D.; Schmid, m.; Baldani, J. I.; Balandreau, J.; Hartmann A.; Caballero-Mellado, J. (2004). *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 54, p. 2155 - 2162.

- Reis, V. M.; Olivares, F. L.; Dobereiner, J. (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its habitat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. v. 10, p. 101 – 104.
- Reis, V. M.; oliveira, A. L. M.; baldani, V. L .D.; Olivares, f. L.; Baldani, J. I. (2006). Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: *Nutrição Mineral de Plantas*. Fernandes, M. S. (Ed.). Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Viçosa-MG, cap. VI, p. 153 – 174.
- Reis, V.M., Olivares, F.L., de Oliveira, A.L.M., Reis Jr. F.B., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1999) Technical approaches to inoculate micropropagated sugar cane plants were *Acetobacter diazotrophicus*. *Plant and Soil* 206:205-211.
- Rice, J. A., MacCarthy, P. (1991) Statistical evaluation of the elemental composition of humic substances. *Org. Geochem.* 17: 635-648.
- Roach, B. T.; Daniels, J. A. Review of the origin and improvement of sugar cane. In: COPERSUCAR INTERNATIONAL. SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, Piracicaba
- Rocha, J. C., Rosa, A.H. Substâncias húmicas aquáticas: Interação com espécies metálicas. São Paulo, editora UNESP, 120p.
- Rodda, M.R.C.; Canellas, L.P.; Façanha, A.R.; Zandonadi, D.B.; Guerra, J.G.M.; Almeida, D.L. & Santos, G.A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto I. efeito de doses de humatos. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:649-656, 2006.
- Rodrigues Neto, J., Malavolta, J., Victot, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris pv. citri* Tipo B. *Suma Phytopathologica* 12: 16.

- Rodrigues, L. da S. (2004). Estudo da diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a cultivares de arroz inundado. Tese de Doutorado - Ciência do Solo, UFRRJ, 94 f.
- Roszak, D.B., Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the nature environmental. *Microbiology Reviews* 51:365-379.
- Rumjanek, V.M. (2005) Ressonância Magnética Nuclear. In: Canellas, L.P., Santos, G.A. (eds) Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes: Canellas & Santos, pp.160-184.
- Sala, V. M. R.; Cardos, E. J. R. N.; Freitas, J. G.; Silveira, A. P. D. Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.6, p.833-842, jun. 2007
- Santos, C. C. R. dos; Perin, L.; Baldani, J. I. E Reis, V. M. (2006). Isolamento de *Gluconacetobacter* spp. em diferentes tipos de solos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 4, n. 1, p. 85 – 92.
- Santos, G.A., Camargo, F.A.O. (1999) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Santos, G.A., Camargo, F.A.O. (eds). Porto Alegre: Gênese, 508p.
- Saravanan, V. S.; Madhaiyan, M.; Thangaraju, M. (2007). Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*. v. 66, p. 1794 – 1798.
- Schnitzer, M. (1991) Soil organic matter: the next 75 years. *Soil Science* 151:41-58.
- Schnitzer, M., Gupta U.C. (1965) Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society Proceedings*, 27: 274-277.

- Shearer, G., Kohl, D. H. (1986) N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Aust. J. Plant Physiol.* 13:699-756.
- Silva, M. F. (2009) Uso de inoculante polimérico contendo bactérias Diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar. UFRRJ. Tese de Doutorado 80p.
- Simpson, A.J. (2002) Determining the molecular weight, aggregation, structures and interactions of natural organic matter using diffusion ordered spectroscopy. *Magnetic Res. Chem.* 40: 572-582.
- Singh, M. S., DEVI, R. K. T., Sinhg, N. I. (1999). Evaluation of methods for Azotobacter application on the yield of rice. *Indian Journal of Hill Farming.* v. 12, p. 22 – 24.
- Singh, R.B. (2000) Environmental consequences of agricultural development: a case study from the green revolution state of Haryana, India. *Agriculture Ecosystems and Environment* 82:97-103.
- Somers, E.; PTACEK, D.; GYSEGOM, P.; SRINIVASAN, M.; VANDERLEYDEN, J. (2005). Azospirillum brasilense produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology.* v. 71, n. 4, p. 1803 – 1810.
- Souza, S.R.; Fernandes, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. (Ed) *Nutrição Mineral de Plantas.* Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa-MG, 2006. p. 215-252.
- Stevenson, F.J. (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions.* New York: Wiley, 496p.
- Stevenson, G.C. 1965. *Genetics and breeding of sugarcane.* Longmans, London. 284p.

- Stupiello, J.P. A cana-de-açúcar como matéria-prima. In: PARANHOS, S. B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 7, p. 761-804.
- Sumner, M. E.. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Science*, New York, v.12, p. 53–123. 1990
- Sundara, B.; Natarajan, V.; Hari, K. (2002). Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. *Field Crops Research*. v. 77, p. 43 – 49.
- Swift, R.S., Delisle, G., Leonard, R.L. (1987) Biodegradation of humic acids from New Zealand soils. *The Science of the Total Environment* 62:423-430.
- Tarrand, J. J.; Krieg, N. R.; Döbereiner J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*. v. 24, 967 - 980.
- Tejada, M.; Gonzalez, J.L. Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *Europe Journal of Agronomy*, v.21, p.31-40, 2004.
- Tsimilli-Michael, M.; Eggenberg, P.; Biro, B. (2000). Synergistic an antagonistic effects of Arbuscular mycorrhizal fungi and *Azospirillum* and *Rhizobium* nitrogen-fixers on the photosynthetic activity of alfafa, probed by the polyphosphoryl a fluorescent transient O-J-I-P. *Applied Soil Ecology*. v. 15, p. 169 182.
- Urquiaga, S.; Cruz, K. H. S.; Boddey, R. M. . Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*, Winsconsin, v. 56, n. 1, p. 105-114, 1992.

- Urquiaga, S.; Malavolta, E. Uréia: um adubo orgânico de potencial para a agricultura orgânica.. *Cadernos de Ciência e Tecnologia (EMBRAPA)*, Brasília, v. 19, n. 2, p. 333-339, 2002.
- Vallis, I.; Haydock, K. P.; Ross, P. J.; Henzell, E. F. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pastures. III. The uptake of small additions of ¹⁵N-labelled fertilizer by rhodes grass and Townsville lucerne. *Australian Journal of Agriculture Research* 18:865-877, 1967.
- Vandamme, P.; Goris, J.; Chen, W. M.; Vos, DE P. E Willems, A. (2002). *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. *Systematic Applied of Microbiology*. v. 25, 507 - 512.
- Vaughan D., Malcolm R.E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. *In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (eds.), Soil Organic Matter and Biological Activity*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 37–75.
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promotion rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil*. v. 255, p. 571 – 586.
- Visser, S.A (1984) Effect of humic acids on numbers and actives of micro-organisms within physiological groups. *Org. Georchem*. 8:81-85.
- 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).
- Vitti, A. C.; Trivelin, P. C. O.; Gava, G. J. C.; Franco, H. C. J.; Bologna, I.R.; FARONI, C. E. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre os resíduos culturais em canavial sem queima. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, v. 31, n.3, p. 491-498, maio/jun. 2007.

- Vitti, G. S.; Queiroz, F. E. C.; Otto R.; Quintino, T. A. Nutrição e adubação da cana-de-açúcar. Bebedouro, SP, 2005. 78 p. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Nutricao+cana+GVitti_000fh3r3vzp02wyiv80rn0etnmc6zamd.pdf > Acesso em: 12. Dez. 2008. Palestra apresentada para a equipe da Stoller em fevereiro de 2005.
- Weber, O.B.; Correia, D.; Silveira, M.R.S.; Crisóstomo, L.A.;Oliveira, E.M. de; SÁ, E.G. Efeito de bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.38, p.689-696, jun. 2003.
- Werber, O. B.; Terão, D.; Rocha, L. S.; Correia, D.; Santo, F. J. S. Efeito de bactérias diazotróficas na produção de abacaxizeiro “cayenne champac”, sob irrigação, em dois níveis de adubação Nitrogenada. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 26, n. 2, p. 249-253, Agosto 2004
- Wershaw, R.L. (1993) Model for humus in soil and sediments. *Environ. Sci. Technol.* 27:814-816.
- Willians, L.E.; Miller, A.J. Transporters responsables for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology. V. 52, p. 659-688, 2001.
- Xavier, R. P. Contribuição da fixação biológica do nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar. 2006 87p. Tese (Doutorado). Universidade federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ
- Xie, C. H.; Yokota, A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a notrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. v. 55, 1435 -1438.

- Yuanagi, Y., Tamaki, H., Otsuka, H., Fujitake, N. (2002) Comparasion of decolorization by microorganisms of humic acids with different ^{13}C NMR properties. *Soil Biology & Biochemistry* 34:729-731.
- Zahir, Z.A., Asghar, H.N., Arshad, M. (2001) Cytokinin and its precursors for improving growth and yield of rice. *Soil Biology and Biochemistry* 33: 405-408.
- Zandonadi, D.B. (2006) *Bioatividade de ácidos húmicos: promoção do desenvolvimento radicular e atividade das bombas de H^+* . Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 161p.
- Zandonadi, D.B.; Canellas, L.P.; Façanha, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H^+ pumps activation. *Planta*, v.225, p.1583-1595, 2007