

EFEITO GENOTÍPICO DA CANA DE AÇÚCAR COM OS  
DIFERENTES ESTÁGIOS DE INOCULAÇÃO E REINOCULAÇÃO DO  
BIOSTIMULANTE CONTENDO BACTÉRIAS BENÉFICAS E ÁCIDOS  
HÚMICOS

**DEYSE JACQUELINE DA PAIXÃO MALCHER**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO- 2021

**EFEITO GENOTÍPICO DA CANA DE AÇÚCAR COM OS  
DIFERENTES ESTÁGIOS DE INOCULAÇÃO E REINOCULAÇÃO DO  
BIOSTIMULANTE CONTENDO BACTÉRIAS BENÉFICAS E ÁCIDOS  
HÚMICOS**

**DEYSE JACQUELINE DA PAIXÃO MALCHER**

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 Doutora em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MARÇO- 2021

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**UENF - Bibliotecas**  
**Elaborada com os dados fornecidos pela autora.**

M242 Malcher, Deyse Jacqueline da Paixão.

Efeito genotípico da cana-de-açúcar com os diferentes estágios de inoculação e reinoculação do biostimulante contendo bactérias benéficas e ácidos húmicos / Deyse Jacqueline da Paixão Malcher. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2021.  
43 f.

Bibliografia: 37 - 43.

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2021.  
Orientador: Fabio Lopes Olivares.

1. Bioestimulação. 2. Mudas Pré-germinadas. 3. Genótipos. 4. Ontogenia. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 630

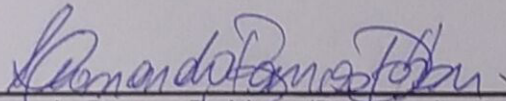
EFEITO GENOTÍPICO DA CANA DE AÇÚCAR COM OS  
DIFERENTES ESTÁGIOS DE INOCULAÇÃO E REINOCULAÇÃO DO  
BIOSTIMULANTE CONTENDO BACTÉRIAS BENÉFICAS E ÁCIDOS  
HÚMICOS.

**DEYSE JACQUELINE DA PAIXÃO MALCHER**

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 Doutora em Produção Vegetal.

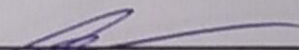
Aprovada em 26 de março de 2021

Comissão Examinadora.



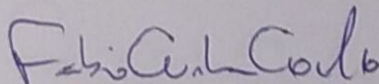
---

Leonardo Barros Dobbss (Dr., Produção vegetal) - UFVJM



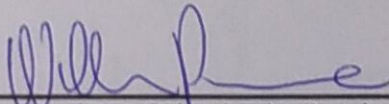
---

Josil de Barros Carneiro Junior (Dr., Produção vegetal) – UFRRJ



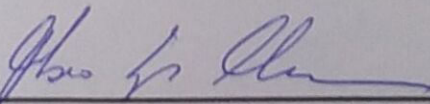
---

Fábio Cunha Coelho (Dr., Fitotecnia) – UENF



---

Willian Pereira (Dr., Ciência do Solo) – UFRRJ (Co-orientador)



---

Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Ciência do Solo) – UENF  
(Orientador)

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar. Mas  
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.  
(Madre Teresa de Calcutá)

Aos meus pais Arnaldo Malcher e Dalva  
Malcher, todo o apoio e carinho fornecido  
nas horas de alegria e tristeza.

Dedico este trabalho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por fazer parte das minhas escolhas e decisões;

Aos meus pais Arnaldo Pinheiro Malcher e Dalva da Paixão Malcher e minha irmã (Natalia da Paixão Malcher) pelo amor, carinho, dedicação e muito incentivo que sempre me demonstraram;

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (PPV), pela oportunidade de realização do curso;

Ao meu orientador Dr. Fábio Lopes Olivares, pela ajuda e confiança que teve ao longo do desenvolvimento do meu doutorado;

Ao meu coorientador Willian Pereira, pela confiança e dedicação ao longo dos experimentos;

A todos os colegas da UENF, em especial aos amigos do laboratório do Núcleo de Desenvolvimento de Insumos Biológicos para a Agricultura e Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (NUDIBA/LBCT), pela ajuda nos trabalhos e pelos momentos de descontração que foram cruciais durante essa jornada;

Aos funcionários e estagiários da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Campus Campos dos Goytacazes (UFRRJ-CCG), pela ajuda nas conduções experimentais, sem eles tudo seria bem mais difícil.

Aos amigos que conquistei em Campos dos Goytacazes/RJ, tornaram os meus dias mais alegres e amenizaram a saudade de casa, principalmente, as companheiras de república Marlene Vieira e Gleyce Kelly;

Os meus sinceros agradecimentos a todos que de algum modo colaboraram, torceram e incentivaram a conclusão deste trabalho.

Gratidão a todos!

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. HIPÓTESE .....	4
3. OBJETIVO .....	4
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
4.1. A cana de açúcar no Brasil.....	5
4.2. Interação das bactérias benéficas na cana-de-açúcar .....	7
4.3. Substâncias húmicas na promoção do crescimento vegetal da cana-de-açúcar. ....	8
4.4. Associação da cana-de-açúcar com bioestimulante a base de bactérias benéficas e substâncias húmicas.....	10
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
5.1. Local da condução experimental, genótipos utilizados e preparo do bioestimulante .....	12
5.2. Experimento 1: Aplicação de bactérias benéficas e ácidos húmicos: efeitos na brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar.....	14
5.3. Experimento 2: Aplicação e reaplicação de bioestimulante na formação de mudas de cana-de-açúcar.....	15



5.4. Experimento 3: Efeito do período de aplicação de bioestimulante na fase inicial do plantio da cana-de-açúcar.....	16
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6.1. Experimento 1: Aplicação de bactérias benéficas e substâncias húmicas: efeitos na brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar.....	21
6.2. Aplicação e reaplicação de bioestimulante na formação de mudas de cana-de-açúcar. ....	23
6.3. Efeito do período de aplicação de bioestimulante na fase inicial do plantio da cana-de-açúcar. ....	27
7. CONCLUSÕES .....	34
8. RESUMO E CONCLUSÕES .....	35
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	37

## RESUMO

MALCHER, Deyse Jacqueline da Paixão; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; março de 2021; Efeito genotípico da cana de açúcar com os diferentes estágios de inoculação e reinoculação do bioestimulante contendo bactérias benéficas e ácidos húmicos.; Orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares.

A utilização de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar (*Saccharum* híbrido) aliada à aplicação de bioestimulantes é uma tecnologia que vem sendo cada vez mais utilizada. No entanto, ainda restam algumas dúvidas em relação ao momento ideal para ocorrer à inoculação e sobre a variabilidade genotípica a ser utilizada, que pode influenciar significativamente na magnitude de resposta. Nesse sentido, objetivou-se com esse trabalho conhecer as respostas de diferentes genótipos de cana-de-açúcar associados à aplicação de bactérias benéficas e ácidos húmicos, nas diferentes ontogenias da planta. Portanto, foram desenvolvidos três experimentos interligados, inoculando e reinoculando o bioestimulante composto das bactérias (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *H. rubrisubalbicans* HCC103 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5) suspensas em ácidos húmicos, extraído de torta de filtro de cana-de-açúcar, na dosagem de 48 mg de C L<sup>-1</sup>. No primeiro experimento foram utilizadas as variedades de cana: RB867515, RB966928, RB969017 e RB036066, aplicando os tratamentos com ou sem a imersão dos mini-toletes no bioestimulante. No segundo experimento as

variedades RB867515, RB966928 e RB969017 foram selecionadas de acordo com a resposta do primeiro experimento. Os mini-toletes brotados foram transplantados em tubetes e receberam no plantio 10 mL do bioestimulante, com exceção de parte do controle que recebeu apenas água. Tendo assim os tratamentos: C (controle); B (bioestimulado na brotação); C-M (controle, inoculado nas mudas) e B-BM (bioestimulado, inoculado na brotação e nas mudas). No terceiro experimento as RB867515, RB966928 foram selecionadas e conduzidas ao plantio em ambiente aberto, onde foi realizada uma nova inoculação, com 200mL/planta de bioestimulante e parte do controle recebeu apenas água, ficando assim oito tratamentos: C (controle); C-P (controle, inoculado no plantio); C-M (controle, inoculação nas mudas); C-MP (controle, inoculação nas mudas e no plantio); B (bioestimulado na brotação); B-BP (bioestimulado, na brotação e no plantio); B-BM (bioestimulado, na brotação e nas mudas) e B-BMP (bioestimulado, na brotação, nas mudas e no plantio). As avaliações feitas nos experimentos foram desde a brotação, para obter a porcentagem e índice de velocidade brotação, de cada variedade. Foram feitas também avaliações biométricas das plantas e análise do sistema radicular, durante a formação das mudas e durante o desenvolvimento inicial das plantas. Inicialmente, a aplicação do bioestimulante teve efeito benéfico apenas na variedade RB036066, com incremento positivo de 10% na brotação, em relação ao controle. Na formação das mudas os tratamentos de inoculação e reinoculação do bioestimulante mostraram-se eficiente em dois genótipos testados: RB867515 e RB966928. No terceiro experimento, em ambiente aberto, os tratamentos mais eficientes no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar foram: C-MP na RB867515, B-BM e B-BP na RB966928. Ou seja, foram necessárias duas inoculações ao longo da ontogenia das plantas. Na RB966928, apesar da inoculação no mini-tolete não ter sido favorável no início da brotação, realizar reaplicações ao longo do desenvolvimento da planta foi de fundamental importância. Concluiu-se com as evidências experimentais obtidas nesse trabalho, foram necessárias duas inoculações ao longo da ontogenia das plantas. Apesar do tratamento com o bioestimulante não ter sido favorável no início da brotação, para alguns genótipos, faz-se necessário observar a planta ao longo do seu desenvolvimento vegetativo.

**Palavras-chave:** Bioestimulação, Mudas Pré-germinadas, Genótipos, Ontogenia.

## ABSTRACT

MALCHER, Deyse Jacqueline da Paixão; D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March 2021; Genotypic effect of sugarcane with the different stages of inoculation and reinoculation of the biostimulant containing beneficial bacteria and humic acids.; Advisor: Prof. Fabio Lopes Olivares.

The use of pre-sprouted seedlings (MPB) of sugarcane (*Saccharum* hybrid) combined with the application of biostimulants is an increasingly used technology. However, there are still some doubts regarding the ideal time for inoculation and the genotypic variability, which can significantly influence response magnitude. In this sense, the objective of this work was to know the responses of different sugarcane genotypes associated with the application of beneficial bacteria and humic acids in the different ontogeny of the plant. Therefore, three interconnected experiments were carried out, inoculating and re-inoculating the biostimulant composed of bacteria (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *H. rubrisubalbicans* HCC103 and *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5) suspended in humic acids, extracted from sugarcane filter cake, at the dosage of 48 mg of CL<sup>-1</sup>. For the first experiment, four sugarcane varieties were used: RB867515, RB966928, RB969017 and RB036066 and two treatments: with or without the immersion of the small stalks in the biostimulant. In the second experiment, the varieties RB867515, RB966928 and RB969017 were selected according to the response of the first experiment. Then, the sprouted small stalks were transplanted into tubes and received 10 mL of the biostimulant at planting, except for part of the control that received only water. Thus, the treatments: C (control); B (biostimulation at sprouting); C-M (control, inoculated in seedlings) and B-BM (biostimulation, inoculated in sprouting and seedlings). In the third experiment, RB867515, RB966928 were selected and planted in an open environment, where a new inoculation was carried out, with 200mL/plant of biostimulant and part of the control received only water, thus leaving eight treatments: C (control); C-P

(control, inoculated at planting); C-M (control, seedling inoculation); C-MP (control, seedling and planting inoculation); B (biostimulation at sprouting); B-BP (biostimulation, at sprouting and at planting); B-BM (biostimulation, at sprouting and in seedlings) and B-BMP (biostimulation, at sprouting, in seedlings and at planting). The evaluations made in the experiments were from the sprouting to obtain the percentage and rate of sprouting speed of each variety. Biometric evaluations of the plants and analysis of the root system were also carried out during the seedling formation and the initial development of the plants. Initially, the biostimulant application had a beneficial effect only on the RB036066 variety, with a positive increase of 10% in sprouting concerning the control. In the formation of seedlings, the treatments of inoculation and reinoculation of the biostimulant proved to be efficient in two genotypes tested: RB867515 and RB966928. In the third experiment, in an open environment, the most efficient treatments in the initial development of sugarcane were: C-MP in RB867515, B-BM and B-BP in RB966928. That is, two inoculations are necessary throughout the ontogeny of the plants. In RB966928, despite the inoculation in the small stalks not being favourable at the beginning of the sprouting, it was of fundamental importance to carry through reapplications during the development of the plant. In conclusion, with the experimental evidence obtained in this work, two inoculations are necessary throughout the ontogeny of the plants. Although the biostimulation treatment is not favourable at the beginning of sprouting, it is necessary to observe it for some genotypes throughout the vegetative development of the plants.

**Keywords:** Biostimulation, Pre-sprouted Seedlings, Genotypes, Ontogeny.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil desempenha importante papel global na produção e comercialização de commodities agrícolas, que cresce a cada ano com a adoção de novas tecnologias e dentre as principais culturas agrícolas brasileiras, está à cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (Barreto et al., 2019).

A cana-de-açúcar é considerada uma alternativa viável para o setor de biocombustível, pois apresenta um grande potencial na produção de etanol, além de atuar na geração de energia elétrica, reduzindo os custos de produção (CONAB, 2019). E o etanol produzido exerce papel fundamental, no apelo mundial por energia limpa, que é utilizar combustíveis que reduzam a emissão de gases de efeito estufa e que esteja disponível em grande escala (Schultz et al., 2015).

Ao longo dos anos, a cana-de-açúcar teve um aumento expressivo de sua área cultivada, o que culmina por demandas por novas tecnologias de produção, que reduzam os impactos ambientais e promovam ganhos de produtividade (De Oliveira et al., 2018). Além do mais, para que haja uma otimização do rendimento da cana-de-açúcar, a recomendação técnica sugere que 20% dos canaviais sejam renovados anualmente (Matoso et al., 2017).

Sendo assim, o estudo dos fatores que mais interferem na produção e na qualidade da cultura é de fundamental importância, e dentre eles, estão: a interação edafoclimática, o manejo e a variedade escolhida (Maule et al., 2001). Além desses estudos, May e Ramos (2019) destacam o uso de colmos (toletes) como unidade propagativa para instalação do canavial.

E umas das formas mais eficientes de reforma de canaviais são por meio da utilização de mudas pré-brotadas (MPB), que consiste em mudas provenientes de mini toletes ou mini rebolos, produzidas sob condições controladas de casa de vegetação. O sistema MPB promove uniformidade nas linhas de plantio e diminuição do número de gemas de 15-21 gemas/metro (Landell et al. (2012).

A prática do plantio convencional no cultivo da cana envolve o uso de aproximadamente 18 t de hastes por hectare, gerando custo e volume de material muito grande para implantar ou renovar o canavial (Matoso et al., 2019). A utilização da tecnologia de mudas de cana pré-brotadas no plantio requer apenas um broto para a produção de mudas e reduz em 90% o volume de material de propagação aplicado. Ou seja, reduz colmos por hectare, aumenta a taxa de multiplicação e uniformidade do plantio (De Oliveira et al., 2018).

No Brasil a demanda de renovação de 20% do canavial, corresponde há 1,8 milhões de hectares, que devem ser renovados anualmente, gerando uma demanda de 30 milhões de mudas/ano. Sendo, um dos desafios da cadeia de produção sucroenergética, proporcionar a disponibilidade de mudas de alta qualidade genética e fitossanitária, com alto rendimento de produção (Matoso et al., 2017).

Nesse sentido, a tecnologia de mudas pré-brotadas (MPB), vem sendo cada vez mais utilizadas nas reformas de canaviais, que consiste em mudas provenientes de mini toletes ou mini rebolos, produzidas sob condições controladas de casa de vegetação (Landell et al., 2012).

Apesar disso, é uma tecnologia ainda em expansão (De Oliveira et al., 2018), sobretudo quando complementa a tecnologia com a utilização de bioestimulante.

Os estudos de cunho de produção sustentável da cana-de-açúcar tem como um dos objetivos reduzir a dependência por fertilizantes sintéticos, pelo incremento da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) ou pela melhoria da eficiência de uso do nitrogênio, isto é, a produção de colmos por unidade de

nitrogênio incorporado na biomassa (Robinson et al., 2016), e a aplicação desses bioestimulantes mostrou-se eficiente na cultura da cana-de-açúcar em diversos trabalhos (Marques Júnior et al., 2008)

A eficiência da FBN também depende das diferenças genéticas entre variedades de cana, pois, segundo Chaves et al. (2015), a variabilidade genotípica influencia nas respostas da cana-de-açúcar à inoculação.

Com relação à qualidade genética da cana-de-açúcar, existem diferentes variedades já lançadas (Ridesa, 2015) e para que haja um aumento na produtividade dessas, estudos vem avançando em tecnologias a base de bioestimulantes promotores do crescimento vegetal. No trabalho desenvolvido por Matoso et al. (2019) os autores observaram que a inoculação com bactérias diazotróficas resultou em aumentos significativos no crescimento e no acúmulo de nitrogênio das mudas de cana-de-açúcar, no entanto, o fator que mais influenciou nas respostas da inoculação foi às variedades utilizadas, bem como o substrato usado para a formação das mudas.

Autores como Matoso et al. (2019) relataram também, que uma maior eficiência da bioestimulação pode ocorrer ao longo estágio fenológico da planta e que fatores bióticos e abióticos podem vir a interferirem no efeito da interação genótipo-planta e a inoculação/aplicação (Andreote et al., 2014).

Apesar da eficiência da aplicação dos bioestimulantes, pode haver variações dos efeitos positivos em relação ao crescimento e desenvolvimento das plantas, por exemplo, a aplicação pode potencializar produção de ramos vegetativos e não alterar a produtividade da cultura (Lopes et al., 2020)

Nesse sentido, ainda existem algumas lacunas que faltam ser preenchidas com relação aos assuntos descritos acima como: Qual é a fase ideal para que a aplicação do bioestimulante (inoculação) ocorra? Será que as respostas podem variar de acordo com o tempo de aplicação e reaplicação? Sendo assim, os estudos devem avançar no sentido de compreender melhor a interação dos diferentes genótipos da cultura quanto à resposta da tecnologia dos estimulantes biológicos.



## 2. HIPÓTESE

A resposta do bioestimulante é influenciada pela fase de aplicação e variabilidade genética da cana-de-açúcar. Sendo, necessárias reaplicações, durante as fases genotípicas das plantas.

## 3. OBJETIVO

O objetivo do trabalho foi conhecer as magnitudes de respostas da aplicação do bioestimulantes à base de bactérias diazotróficas endofíticas mais ácidos húmicos (AH), em diferentes genótipos de cana-de-açúcar, nas diferentes fases das plantas, a saber: na brotação dos mini-toletes, na formação das mudas e no início do plantio. Tencionou-se fornecer informações sobre a variabilidade de resposta do material genético à inoculação e o momento da aplicação.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. A cana de açúcar no Brasil.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) (Matoso et al., 2019) e nos últimos anos, a cultura vem expandindo-se para novas áreas agrícolas, especialmente em pastagens degradadas, influenciando decisivamente o desenvolvimento econômico, social e cultural da maioria das regiões (Schultz et al., 2017).

No terceiro levantamento da safra 2020/21 a produção de cana-de-açúcar é estimada em 665,1 milhões de toneladas, indicando incremento de 3,5% em relação à safra 2019/2020. A estimativa da área de produção está em 8.605 hectares, com pequena variação de 1,9% de incremento, quando comparada a safra anterior. Esse fato está atrelado principalmente ao aumento de área de produção na Região Sudeste, em especial nos Estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo, sendo a região paulista considerada como o principal estado produtor do país, com estimativa de área de 4.427 hectares (Conab, 2020).

A expansão agrícola da cana-de-açúcar nos últimos anos ocorreu especialmente em pastagens degradadas, influenciando decisivamente o desenvolvimento econômico, social e cultural da maioria das regiões (Schultz et al., 2017). Portanto, é uma cultura de grande importância para a produção brasileira de energia renovável, no qual a matriz Energética Brasileira de fontes renováveis manteve-se entre as mais elevadas do mundo 43,5% em 2016. Sendo que, 17,5% dessa matriz energética são provenientes da biomassa da cana de açúcar. As demais energias correspondem à hidráulica com 12,6%, a lenha e o carvão vegetal 8% e outras fontes 5,4% (Ben, 2017).

Com toda essa importância que a cana apresenta no cenário brasileiro, estudos vem sendo crescentes em relação a variedades que melhor se adaptem as condições climáticas diversas do nosso país. Nesse sentido foi criada em 1990 a Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), onde torna-se conhecida nacional e internacionalmente como líder no desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar (Ridesa, 2010). Segundo Daros et al. (2015), com o êxito do programa de melhoramento da RIDESA pode-se observar uma evolução do cultivo das variedades RB (República do Brasil), que representavam apenas 5% das variedades cultivadas no Brasil, na safra 1990/1991 e com o êxito do programa até a safra 2014/2015 já apresentava uma área cultivada de 68% de cultivo das variedades RB nas empresas agroindustriais do Brasil.

Dentre as RB's mais plantadas no Brasil é interessante destacar a RB867515, liberada em 1997 pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) ainda pelo PLANALSUCAR, responsável por 9,35% da área de plantio na região do Estado de São Paulo e Mato Grosso do sul (Ridesa, 2020). É uma variedade que venceu desafios, especialmente pelo fato de ter expandido sua área de plantio em solos de baixa fertilidade, solos arenosos e com restrições hídricas, visto que até o seu surgimento outras variedades não tinham apresentado esse desempenho de cultivo. A RB867515 é uma variedade proveniente de um policruzamento. Ou seja, a sua progenitora RB72454 foi fecundada ao acaso com pólen de diversas outras variedades (Ridesa, 2015).

Outra variedade de grande destaque devido sua área de plantio é a RB966928, com 13,06% da área de plantio na região do Estado de São Paulo e Mato Grosso do sul (Ridesa, 2020). É uma variedade desenvolvida pela

Universidade Federal do Paraná (UFPR), que ao ser liberada pela Ridesa em 2010, apresentou grande êxito em plantios de colheitas mecanizadas, com boa adaptação e produtividade em ambientes médios e de excelente capacidade de brotação das soqueiras. Sendo assim, bastante indicada na colheita mecanizada (Ridesa, 2015).

No ano de 2015 a RIDESA liberou 16 novas variedades, em comemoração aos seus 25 anos da Rede e 45 anos de variedades RB's. Dentre elas foram lançadas a RB969017 e RB036066. A variedade RB969017 foi criada pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), lançada para atender os ambientes de plantio de cana-de-açúcar dos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, nordeste de Minas Gerais e sul da Bahia, áreas de abrangência das pesquisas da UFRRJ. É uma variedade de rápida brotação e desenvolvimento, com alto teor de sacarose e alta produtividade agrícola. Apresenta excelente brotação em cana-planta e em soqueiras.

Já a variedade RB036066 foi criada pela UFPR apresentando ótima brotação e perfilhamento em cana-planta e cana-soca e fechamento de entre linhas. Esta variedade tem alta produtividade agrícola e tem maturação média (Ridesa, 2015).

#### 4.2. Interação das bactérias benéficas na cana-de-açúcar

As bactérias diazotróficas endofíticas colonizam várias plantas não leguminosas, induzindo diferentes mecanismos, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização mineral, produção de fitohormônios e biocontrole de patógenos, promovendo dessa forma o crescimento das plantas, (Fuentes-Ramirez et al., 1993; Verma et al., 2001; Canellas et al., 2012). A inoculação dessas bactérias na cana-de-açúcar pode contribuir para a sustentabilidade, pois atua nos mecanismos de promoção de crescimento e suprimento do Nitrogênio via FBN, permitindo ganhos na produtividade e reduzindo a utilização de insumos, com consequente diminuição dos custos de produção (Chaves et al., 2015). De acordo com Baldani et al. (2002) o sucesso da cana-de-açúcar pode continuar por muitos anos, considerando seu potencial exploração, onde, os resultados são promissores envolvendo a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em plantas de cana-de-açúcar.

Os estudos envolvendo o incremento da FBN em cana-de-açúcar tiveram suas bases conceituais inicialmente estabelecidas na metade do século XX, iniciados com o trabalho pioneiro de Döbereiner (1953), quando foi observada a ocorrência de *Azotobacter chroococcum* e *Beijerinck* sp. em solos ácidos. Desde então, já foram publicados diversos trabalhos com bactérias fixadoras de nitrogênio, nessa cultura.

O inoculante com base em bactérias diazotróficas promove incremento no desenvolvimento e na produtividade da cana-de-açúcar similar à adição de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N fertilizante, no entanto, esse parâmetro depende da variedade trabalhada (Schultz et al., 2012). Segundo Chaves et al. (2015) essa variação pode estar relacionada com o genótipo da planta e principalmente com as condições da fertilidade do solo, mas, em se tratando de uma cultura de grande extensão territorial, o suprimento de cerca de 30% da demanda de N pela FBN certamente trará benefícios ambientais e econômicos para essa cultura.

Essas respostas diferenciadas do inoculante na cultura da cana são influenciadas tanto pelos genótipos quanto pelas condições climáticas do meio, como foi observado em experimento de campo por Schultz et al. (2012). Ou seja, a diferença do genótipo da cana-de-açúcar influencia na resposta à inoculação (Chaves et al., 2015). No entanto, com o avanço da genética selecionando novas cultivares que utilizem fontes de N na dosagem recomendada e abaixo da recomendada, podem-se identificar genótipos responsivos ou não ao nitrogênio que ajudarão a selecionar materiais que contribuem para o uso eficiente de nitrogênio (Robinson et al., 2016), visto que o uso de bactérias fixadoras de N em cana-de-açúcar não substitui a adubação nitrogenada, mas reduz a utilização desse fertilizante.

#### 4.3. Substâncias húmicas na promoção do crescimento vegetal da cana-de-açúcar.

As substâncias húmicas (SH) são divididas em três frações com distintas características físico-químicas e classificadas com base na solubilidade em meio ácido ou alcalino, em: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e humina (H) (Canellas e Santos, 2005), são os principais componentes da matéria orgânica do solo (85 a 90 %) e originam-se a partir de transformações bioquímicas de

compostos como lignina, celulose, hemicelulose, açúcares e aminoácidos (Silva e Mendonça, 2007).

As substâncias húmicas podem estar envolvidas em rotas de estimulação do bombeamento de  $H^+$ , mediado pela  $H^+$ -ATPase, levando ao aumento da absorção de nutrientes e da expansão celular. Essa teoria está relacionada com a acidificação do apoplasto, que por sua vez ativam enzimas específicas que atuam sobre a parede celular aumentando sua plasticidade, influenciando no processo de crescimento e alongamento da célula vegetal, relacionado com a teoria do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992). Neste contexto, as moléculas de AH se apresentam como reservatórios bioativos de moléculas com atividades auxínicas (Canellas e Santos, 2005).

Desta forma, os AH têm sido usados como bioestimulantes aplicados diretamente no solo ou via foliar, principalmente por influenciarem no metabolismo das plantas (Barral, 2015). E também são utilizados como veículo de introdução de microrganismos diazotróficos endofíticos em sistemas de produção agrícola (Canellas et al., 2012). Alterando diretamente o metabolismo bioquímico das plantas e por consequência, podendo influenciar no seu crescimento e desenvolvimento (da Rosa et al., 2009).

Na cana-de-açúcar, a aplicação do AH em mini-toletes, promoveu um aumento significativo na área radicular (Marques et al., 2008). E quando aplicado via foliar, o bioestimulante a base de AH, após 60 dias de emergência da cana-de-açúcar, apresentou um aumento de 37% do rendimento do caule quando comparado as plantas que não receberam o AH, além disso, apresentou aumento na produtividade em 24% em relação ao controle, na segunda soqueira (Da Silva et al., 2017).

Também foi observado que a aplicação dos ácidos húmicos no solo após 45 dias de brotação da cana-de-açúcar aumentou os níveis de 40 compostos, entre estes metabólitos ligados à resposta ao estresse e ao crescimento celular. Bem como, ácidos chiquímico, cafeico, hidroxicinâmico, putrescina, ácido beênico, quinolina xilulose, galactose, lactose prolina, oxiprolina e ácido valérico, em relação ao estresse e adenina e adenosina derivados, ribose, ácido ribônico e ácido cítrico, em relação ao crescimento celular (Aguiar et al., 2018).

#### 4.4. Associação da cana-de-açúcar com bioestimulante a base de bactérias benéficas e substâncias húmicas.

Trabalhos envolvendo a tecnologia de bioestimulante, já vêm sendo descritos na literatura há algum tempo (Marques et al., 2008; Chaves et al., 2015; Da Silva et al., 2017; Schultz et al., 2017), onde bactérias benéficas à agricultura são utilizadas como inoculantes (material contendo microrganismos que atuam no desenvolvimento das plantas, promovendo benefícios econômicos, sociais e ambientais) (Jurandy et al., 2016).

Um outro fator que deve ser levado em consideração visando a melhoria da nutrição nitrogenada na cana-de-açúcar é a utilização do bioestimulantes em associação com bactérias diazotróficas endofíticas mais o componente principal da matéria orgânica que são as substâncias húmicas. Segundo Canellas et al. (2012), a utilização de ácidos húmicos (AH) na composição de bioestimulante vegetais pode funcionar como veículo de introdução de microrganismos diazotróficos endofíticos na planta, promovendo o aumento da população de bactérias introduzidas e auxiliando sobre os seus efeitos benéficos na planta.

O uso dos inoculantes traz grande economia de fertilizante nitrogenado mineral, maior produtividade das culturas, preservação da microbiota e da microfauna do solo, reduzindo o custo de produção (Jurandy et al., 2016).

Além do mais, o uso em conjunto das bactérias diazotróficas endofíticas com os ácidos húmicos vem sendo utilizado, pois a combinação promove o crescimento e desenvolvimento das plantas, devido o fornecimento de nutrientes por meio de uma maior mineralização da matéria orgânica ou pela fixação biológica de N (Marques et al., 2008). Um estudo com mini-toletes de cana-de-açúcar utilizando-se o uso combinado de AH e bactéria, promoveu aumento significativo na área radicular, indicando benefícios dessa associação para o crescimento da espécie em estudo (Marques et al., 2008).

A aplicação via foliar do bioestimulante, após 60 dias de emergência da cana-de-açúcar, apresentou um aumento de 37% do rendimento do caule quando comparado ao controle e incremento na produtividade em 24% em relação ao controle, na segunda soqueira (Da Silva et al., 2017). Além disso, a promoção de crescimento em cana-de-açúcar co-inoculada com HA e *H. seropedicae* mostrou

rendimentos maiores do que plantas não inoculadas por três anos consecutivos, comprovando os benefícios da co-inoculação (Aguar et al., 2018).



## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Local da condução experimental, genótipos utilizados e preparo do bioestimulante

Os experimentos foram conduzidos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Campos dos Goytacazes (UFRRJ-CCG), região norte do Estado do Rio de Janeiro.

A preparação do bioestimulante vegetal utilizado foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LBCT/CBB/UENF).

Nos trabalhos foram analisados quatro genótipos de cana-de-açúcar, (RB867515, RB966928, RB969017, RB036066), que foram selecionados na própria unidade experimental da UFRRJ-CCG, com as suas principais características descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos quatro genótipos de cana-de-açúcar avaliados no trabalho

Genótipos	Produtividade	Velocidade de crescimento	Maturação
RB867515	Alta	Rápido	Média tardia
RB966928	Alta	Rápido	Precoce
RB969017	Alta	Rápido	Precoce-Média
RB036066	Alta	Rápido	Média

(DAROS et al., 2018; RIDESA 2015)

O bioestimulante utilizado nos experimentos, foi composto por uma mistura de bactérias + ácidos húmicos. As bactérias utilizadas foram: *Herbaspirillum seropedicae* (cepa HRC 54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (cepa HCC103) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (cepa PAL 5) suspensas em ácidos húmicos extraídos da torta de filtro de cana-de-açúcar na dosagem de 48 mg C L<sup>-1</sup>. No preparo do inóculo, as cepas foram cultivadas em meio DYGS modificado Rodrigues Neto et al. (1986) a 30° C por 24h em agitador orbital a 150 rpm, até atingir densidade óptica (D.O<sub>540</sub> = 1), contendo aproximadamente 10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup> células.

Foram desenvolvidos três experimentos em continuidade um do outro, o primeiro foi realizado durante a pré-germinação dos mini-toletes de cana-de-açúcar, com e sem a aplicação do bioestimulante. O segundo foi desenvolvido durante a formação das mudas, em tubetes, selecionando os genótipos de acordo com a resposta do primeiro experimento.

No terceiro experimento as mudas, formadas no experimento anterior, foram conduzidas ao plantio em colunas de PVC em ambiente aberto, testando novamente a reinoculação, com bioestimulante.

Todos os dados coletados foram submetidos à análise descritiva (médias ± erro padrão da média), e submetidos à análise de variância (ANOVA) e os dados que apresentaram significância pelo teste F, foram comparados pelo teste de LSD, ao nível de 5% de probabilidade (p<0,05). As análises foram realizadas pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2011) e os gráficos pelo programa GraphPad Prism 7.00.

Os detalhes de cada experimento estão descrito a seguir:

## 5.2. Experimento 1: Aplicação de bactérias benéficas e ácidos húmicos: efeitos na brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar.

O plantio foi realizado em caixas plásticas de 10 kg de substrato comercial Basaplant® autoclavado. A autoclavagem do substrato utilizado no experimento não interferiu nas propriedades químicas dos nutrientes, com exceção apenas do Boro (B), no qual teve uma redução significativa, após a autoclavagem. No entanto, essa redução não influenciou no experimento (Tabela 2).

As caixas foram distribuídas em blocos ao acaso com quatro repetições. Cada repetição consistiu em 20 mini toletes, com gemas individualizadas plantadas a uma profundidade de 0,04 m.

**Tabela 2.** Análise química do substrato, autoclavado (A) e sem autoclavagem (S.A)

	pH	N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	Ca	Mg	C	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B	U
	H <sub>2</sub> O	-----g/kg-----						-----mg/Kg-----						%
A	5	4,62	3,68	2,23	5,20	0,41	278,4	0,56	9460	28	90	190	33,6	33,92
S.A	4,9	5,04	3,77	2,1	5,20	0,40	249,6	0,54	8855	26	90	182	104,8	30,64

Antes do plantio, os minis toletes foram tratados termicamente em banho-maria a 52 ° C por 30 minutos e após foram tratados com fungicida Priori Xtra®, por dois minutos, na proporção de 15L de água para 15 mL do produto. Em seguida, os minis toletes do tratamento bioestimulado receberam o tratamento com as bactérias mais os ácidos húmicos, no qual consistiu na imersão por 30 minutos na solução, sob agitação. E o tratamento controle ficou imerso apenas em água, nas mesmas condições do tratamento bioestimulado.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 4 (com aplicação do bioestimulante e sem aplicação do bioestimulante x quatro genótipos de cana-de-açúcar). Cada tratamento teve quatro repetições, contendo 20 mini-toletes, ou seja, 80 unidades experimentais por

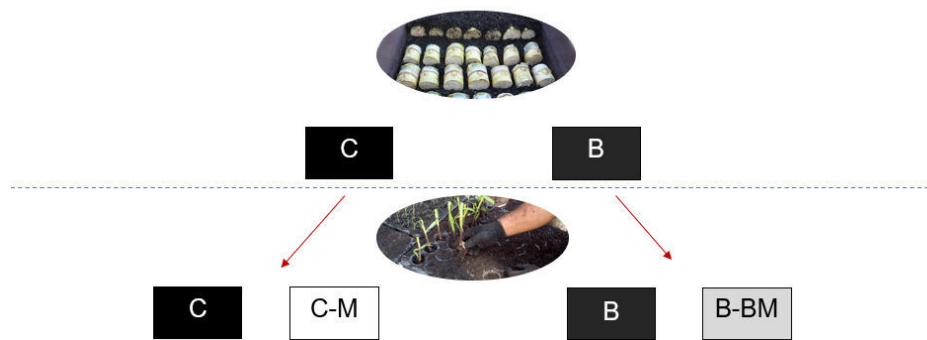
tratamento. Durante a condução do experimento foram realizadas as avaliações da porcentagem de brotação (%) e do índice de velocidade de brotação (IVB), conforme descrito por Maguire (1962), onde:  $IVB = E1 / N1 + E2 / N2 + \dots + En / Nn$ ; onde: E1, E2, ... En = número de mudas normais registradas na primeira contagem, na segunda contagem e na última contagem; N1, N2, ... Nn = número de dias desde a semeadura na primeira, segunda e última contagem. Os tratamentos foram avaliados diariamente por 20 dias, período suficiente para as mudas atingirem a brotação.

### 5.3. Experimento 2: Aplicação e reaplicação de bioestimulante na formação de mudas de cana-de-açúcar.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *campus* Campos dos Goytacazes. E a preparação do bioestimulante ocorreu no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT - UENF).

As variedades de cana-de-açúcar selecionadas nesse experimento foram: RB867515, RB966928 e RB969017, de acordo com os resultados de brotação das mesmas, no experimento anterior.

Os minis toletes pré-brotados, aos 20 dias, foram transplantados em tubetes com capacidade de 290cm<sup>3</sup>, no qual foram preenchidos com substrato comercial Basaplant®. Em seguida, foram distribuídos os tratamentos, sendo estes: C (tratamento controle); C-M (Tratamento controle, inoculado na formação das mudas); B (tratamento bioestimulado na brotação); B-BM (Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação e formação das mudas) (Figura 1). Após o transplante os tratamentos C-M e B-BM receberam 10 mL do bioestimulante por tubete. Já os tratamentos C e B receberam 10 mL de água. O esquema experimental foi fatorial 3 x 4 (três genótipos x quatro tratamentos de bioestimulação), com 20 repetições em cada tratamento.



**Figura 1.** Esquema experimental para realização de tratamentos. Sendo, **C** (tratamento controle); **B** (tratamento bioestimulado na brotação); **C-M** (Tratamento controle, inoculado na formação das mudas) e **B-BM** (Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação e formação das mudas).

Aos 60 dias após o transplante da cana-de-açúcar para os tubetes, foram analisadas características agrônomicas importantes para a formação de mudas, como: altura da planta, com o auxílio de uma régua graduada; diâmetro do caule, com o auxílio de um paquímetro digital; teor de cor verde nas folhas, com o auxílio do equipamento de índice SPAD; contagem do número de folhas e número de perfilhos, pelo método visual.

Foram realizadas também três podas a cada 20 dias, nas quais foi quantificada a massa seca retirada da poda. Para tanto, os materiais foram acondicionados em sacos de papel tipo Kraft, identificados e submetidos à secagem artificial em estufa com circulação de ar forçada a  $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 72 horas.

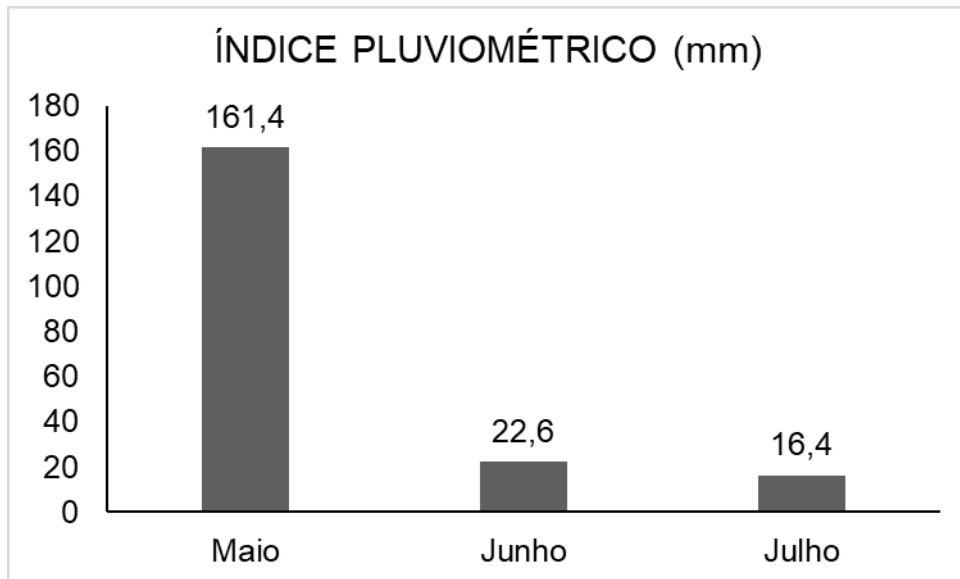
E ao final do experimento, cinco plantas de cada tratamento foram coletadas para análise do sistema radicular, onde as raízes foram lavadas em água corrente sobre peneiras de 2 mm para determinação do comprimento, área de superfície e volume da raiz, por meio do programa WinRhizo.

#### 5.4. Experimento 3: Efeito do período de aplicação de bioestimulante na fase inicial do plantio da cana-de-açúcar

O experimento foi conduzido em uma área aberta na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *campus* Campos dos Goytacazes. E a

preparação do bioestimulante foi realizada da mesma forma dos experimentos anteriores.

Durante a condução do experimento entre os meses de maio a julho de 2019 foi observado o índice pluviométrico na unidade experimental da UFRRJ-CCG que obteve uma taxa de 161,4; 22,6 e 16,4 mm nos meses de maio, junho e julho, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Índice pluviométrico obtido de dados da Estação Climatológica do CCG/UFRRJ.

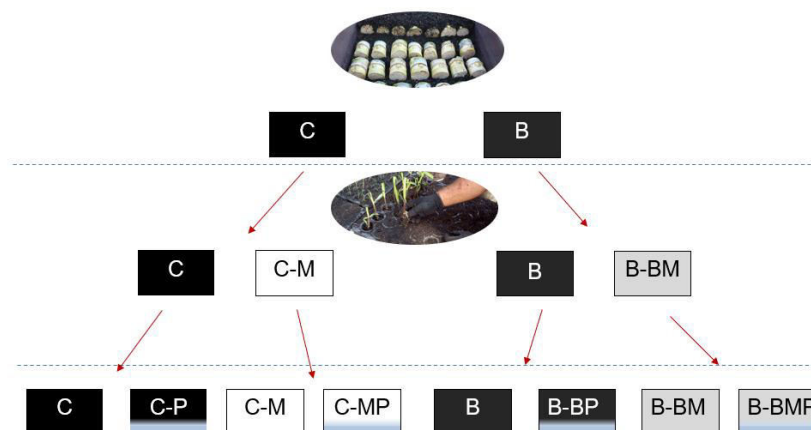
Na condução do experimento foram selecionadas mudas com 60 dias de formação, das variedades RB867515 e RB966928. Partes dessas mudas já haviam recebido o bioestimulante na brotação e/ou na formação das mudas.

Estas foram plantadas em colunas de PVC com dimensões de 1m de altura por 150 mm de diâmetro, preenchido com solo com as características descritas na Tabela 3. A adubação de plantio consistiu em 3 g de N e 4,7 g K<sub>2</sub>O por tubo, o que corresponde a 50 kg ha<sup>-1</sup> de N (fonte de ureia) e 80 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O (cloreto de potássio). Em seguida ao plantio, foi realizada a aplicação do bioestimulante (200 mL por planta), e os tratamentos que não receberam o bioestimulante foram aplicados 200 mL de água.

**Tabela 3.** Análise química do solo, coletada em frente à estação meteorológica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, campus Leonel Miranda

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	C	MO	SB	T	t	m	V	Fe	Cu	Zn	Mn	S	B
H <sub>2</sub> O	mg dm <sup>3</sup>		-----cmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup> -----					-----%-----		---cmol <sub>c</sub> dm <sup>3</sup> ---			----%----		-----mg dm <sup>3</sup> -----					
5,7	7	112	4,1	2,9	0	3,99	0,12	1,51	2,60	7,4	11,4	7,4	0	64,9	62,4	2,4	5,5	52,2	7,04	0,56

Os tratamentos foram: C (tratamento controle); C-P (Tratamento controle, inoculado somente no plantio); C-M (Tratamento controle, inoculado na formação das mudas); C-MP (Tratamento controle, inoculado na formação das mudas e no plantio); B (tratamento bioestimulado na brotação); B-BP Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação e no plantio; B-BM (Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação e formação das mudas) e B-BMP (Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação, formação das mudas e no plantio) (Figura 3).



**Figura 3.** Esquema experimental para realização de tratamentos. Sendo **C** (tratamento controle); **C-P** (Tratamento controle, inoculado somente no plantio); **C-M** (Tratamento controle, inoculado na formação das mudas); **C-MP** (Tratamento controle, inoculado na formação das mudas e no plantio); **B** (tratamento bioestimulado na brotação); **B-BP** Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação e no plantio; **B-BM** (Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação e formação das mudas) e **B-BMP** (Tratamento bioestimulado, inoculado na brotação, formação das mudas e no plantio).

Foram realizadas avaliações a cada 20 dias de: altura da planta (com o auxílio de uma régua graduada); diâmetro do caule (com o auxílio de um paquímetro digital); teor de cor verde nas folhas (com o auxílio do equipamento de índice SPAD) e contagem do número de folhas (pelo método visual). Aos 60 dias, os perfilhos foram contados e o comprimento foi medido.

Ao final do experimento, as plantas foram coletadas e quantificadas a massa seca dos perfilhos e da planta principal. Os materiais foram acondicionados em sacos de papel tipo Kraft, identificados e submetidos à



secagem artificial em estufa com circulação de ar forçada a  $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 72 horas.

O sistema radicular também foi avaliado, de acordo com os perfis de solo em 0-20, 20-40, 40-60 e 60-80 cm de profundidade, e cada segmento foi analisado. Na análise do sistema radicular, as raízes foram lavadas em água corrente sobre peneiras de 2 mm, para determinação do volume e comprimento da raiz, por meio do software WinRhizo.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Experimento 1: Aplicação de bactérias benéficas e substâncias húmicas: efeitos na brotação de mini-toletes de cana-de-açúcar.

De acordo com a análise de variância ANOVA, apenas o fator genótipo apresentou efeito significativo, pelo teste F (Tabela 4). Não ocorreu interação significativa entre genótipo x inoculação, nessa fase inicial da brotação dos mini-toletes de cana-de-açúcar.

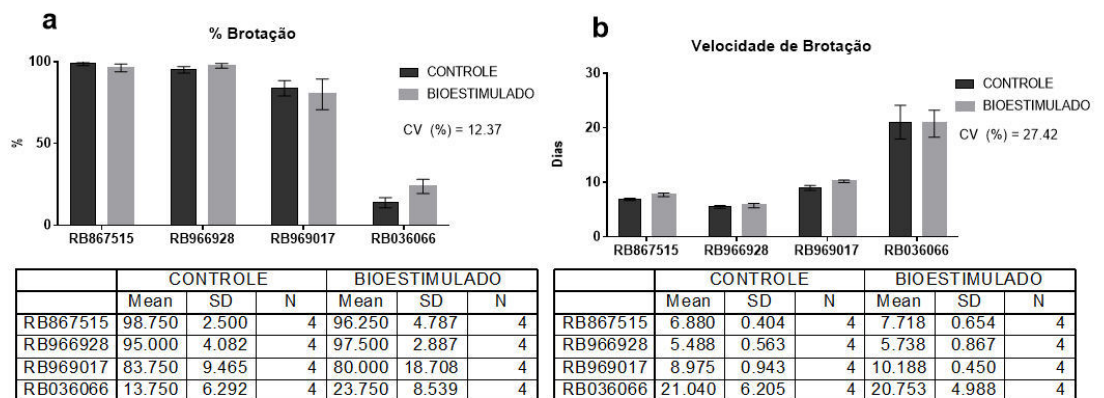
**Tabela 4.** Tabela ANOVA das variáveis: % de brotação e Velocidade de brotação, com e sem aplicação do bioestimulante em quatro genótipos de cana-de-açúcar

FV	GL	% de brotação		Velocidade de brotação	
		QM	F	QM	F
Genótipos (G)	3	11096.3145	133.817*	380.2123	42.979*
Tratamentos (T)	1	19.5312	0.236 <sup>ns</sup>	2.0250	0.229 <sup>ns</sup>
Repetição	3	25.7812	0.311 <sup>ns</sup>	4.2104	0.476 <sup>ns</sup>
G x T	3	77.8645	0.939 <sup>ns</sup>	0.8694	0.098 <sup>ns</sup>
Erro	21	82.9241		8.8464	
C.V. (%)		13.37		27.42	

\* (\*) Efeito significativo de acordo com o teste F ( $P < 0,05$ ), (<sup>ns</sup>) Não significativo.

E ao realizar o teste de médias dentro dos genótipos em relação aos tratamentos, observou-se que a diferença estatística entre os genótipos está relacionada a variedade RB036066 (Figura 4). Ou seja, inicialmente a aplicação do bioestimulante não influenciou a porcentagem e a velocidade de brotação de três genótipos testados (RB867515, RB966928 e RB969017).

Apenas o genótipo RB036066 apresentou 10% a mais de brotação em relação ao controle. Porém, nesse genótipo, mesmo com um aumento positivo na taxa de brotação, sua média geral de brotação ficou abaixo de 50% (Figura 4a), mas, também foi a variedade que mais levou tempo para ocorrer a brotação (Figura 4b).



**Figura 4.** Dados de porcentagem de brotação (a) e tempo médio de brotação (b) dos genótipos RB867515, RB966928, RB969017 e RB036066.

Inicialmente, na fase de brotação das mudas de cana-de-açúcar, o bioestimulante não foi capaz de promover o aumento na porcentagem (%) e na velocidade de brotação das variedades RB867515, RB966928 e RB969017. Esse fato pode estar relacionado às características genéticas do material propagado. Os três materiais são genótipos caracterizados por sua alta produtividade e rápida velocidade de crescimento (Ridesa, 2015), apresentando assim boa brotação no tempo esperado, independentemente de ser bioestimulado.

Já a variedade RB036066 apresentou um longo tempo para germinar. Esse fato pode estar relacionado ao seu tempo médio de maturação. De acordo com Daros et al. (2018), o RB036066 possui alta produtividade e velocidade de crescimento rápido, mas possui maturidade média. Além disso, no caso desse

genótipo, o bioestimulante foi capaz de auxiliar em até 10% na brotação em relação aos não tratados com o bioestimulante vegetal.

Ou seja, nesta fase inicial de brotação, o bioestimulante só foi eficaz em condições de brotação não eficiente (como no caso da RB036066), devido às características genéticas da cana-de-açúcar e fatores como temperatura, umidade e reserva da gema, que podem ter afetado as respostas à inoculação da variedade (Matoso et al., 2019).

Além disso, diferentes bactérias e cepas podem influenciar o efeito hormonal na produção adicional de Ácido indolacético (AIA), que é extremamente importante no acúmulo de biomassa (Da Silva et al., 2012). Como esse bioestimulante contém um conjunto de bactérias endofíticas, que vivem no interior das plantas, a produção de AIA por elas pode ter um efeito dramático e direto no pool da planta e no gradiente de AIA (Hardoim et al., 2008).

## 6.2. Aplicação e reaplicação de bioestimulante na formação de mudas de cana-de-açúcar.

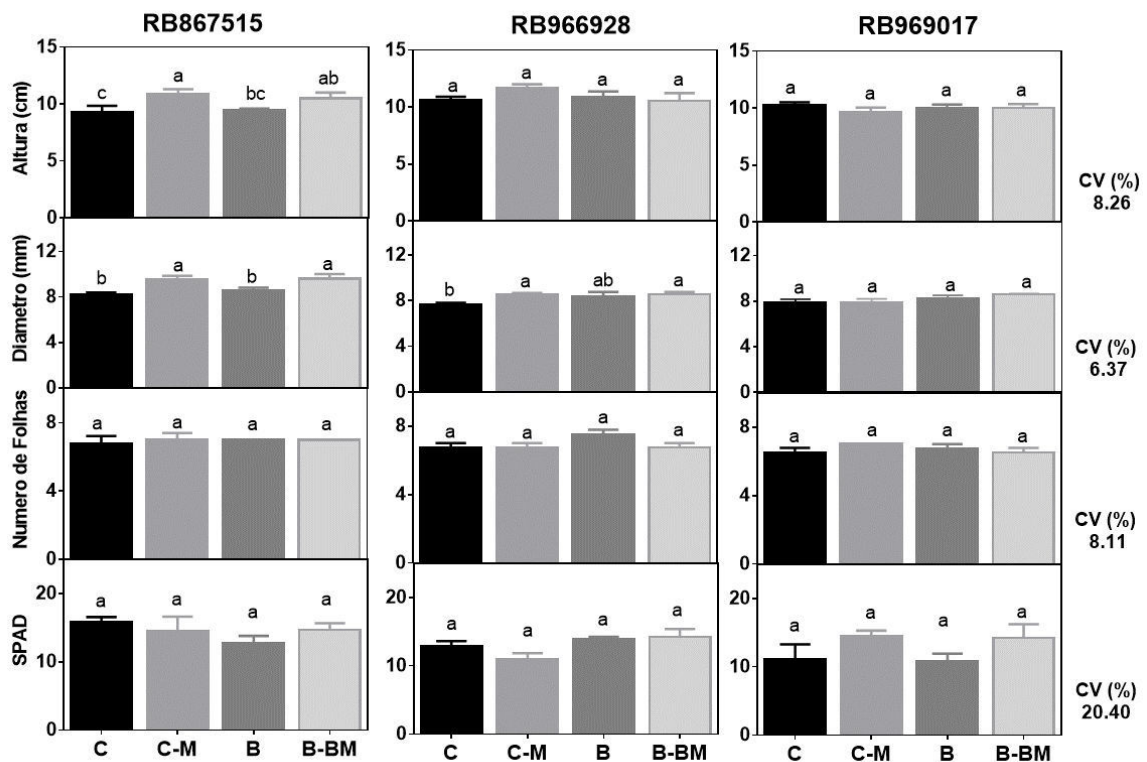
Aos 60 dias de formação das mudas nos tubetes, apenas a massa seca da poda apresentou interação significativa entre os fatores genótipo x tratamentos, conforme Teste F ( $P < 0,05$ ). No entanto, genótipos e tratamentos foram significativos isoladamente para alguns parâmetros (Tabela 5).

**Tabela 5.** Tabela ANOVA das variáveis: altura (H), diâmetro (DIA), número de folhas (NF), índice SPAD e massa seca de poda (MSP), aos 60 dias de formação das mudas em tubetes

FV	GL	H		DIA		NF		SPAD		MSP	
		QM	F	QM	F	QM	F	QM	F	QM	F
Genótipos (G)	2	4.57	6.32*	3.29	11.35*	0.33	1.08 <sup>ns</sup>	14.26	1.92 <sup>ns</sup>	0.13	4.85*
Tratamentos (T)	3	1.13	1.56 <sup>ns</sup>	2.19	7.55*	0.41	1.33 <sup>ns</sup>	7.63	1.03 <sup>ns</sup>	0.26	9.31*
Repetição	3	1.13	1.56 <sup>ns</sup>	0.56	1.93 <sup>ns</sup>	0.19	0.61 <sup>ns</sup>	1.86	0.25 <sup>ns</sup>	0.08	2.76 <sup>ns</sup>
G x T	6	1.32	1.82 <sup>ns</sup>	0.47	1.61 <sup>ns</sup>	0.22	0.72 <sup>ns</sup>	11.76	1.58 <sup>ns</sup>	0.12	4.52*
Erro	33	0.72		0.29		0.31		7.42		0.03	
C.V. (%)		8.26		6.37		8.11		20.40		22.35	

\* (\*) Efeito significativo de acordo com o teste F ( $P < 0,05$ ), (<sup>ns</sup>) Não significativo.

A variedade RB867515 apresentou diferença significativa para altura (H) e diâmetro (DIA), com melhores médias nos tratamentos (C-M) e (B-BM), com aumento de 17,51% e 13,51% na altura e 15,99% 17,39% no diâmetro, em relação ao controle, respectivamente. A variedade RB966928, por outro lado, apresentou diferença significativa apenas para o diâmetro, com destaque também para os tratamentos (C-M) e (B-BM) com 11,37% e 11,96% maior em relação ao controle, respectivamente. Já variedade RB969017 não apresentou diferença entre os tratamentos para os parâmetros avaliados (Figura 5).



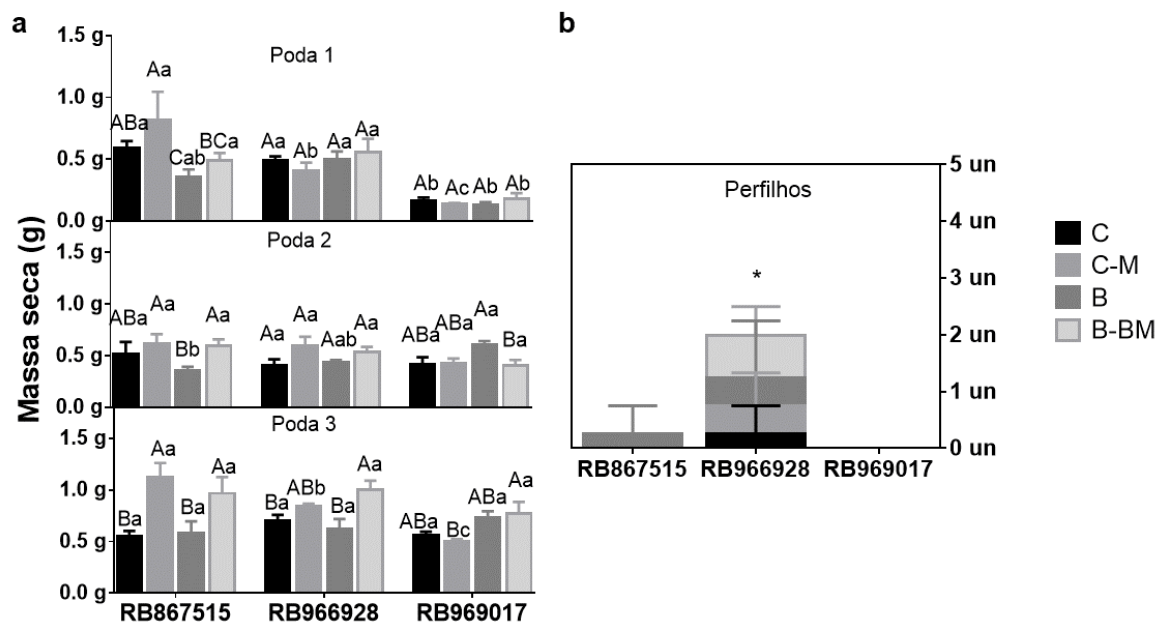
**Figura 5.** Altura, diâmetro, número de folhas e índice SPAD em mudas com 60 dias, das variedades RB867515, RB966928 e RB969017 de cana-de-açúcar sob os tratamentos: Controle (C); controle, inoculado na formação das mudas (C-M); bioestimulado na brotação (B) e bioestimulado na brotação e formação das mudas (B-BM). (\*) médias com as mesmas letras não diferem pelo teste LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Em relação à massa seca da poda, retirada durante a condução da formação da muda, pode-se observar que a RB867515 e a RB966928 foram superiores em quase todos os tratamentos (Figura 6.a). A variedade RB969017 passou a suprir essa diferença de massa seca, na segunda poda, quando os genótipos RB867515 e RB966928 mantiveram sua biomassa. Além disso, os

tratamentos que apresentaram as maiores médias foram C-M e B-BM da primeira até a última poda na variedade RB867515 com um aumento em relação ao controle de 105,47% e 76,45%, respectivamente, na última poda.

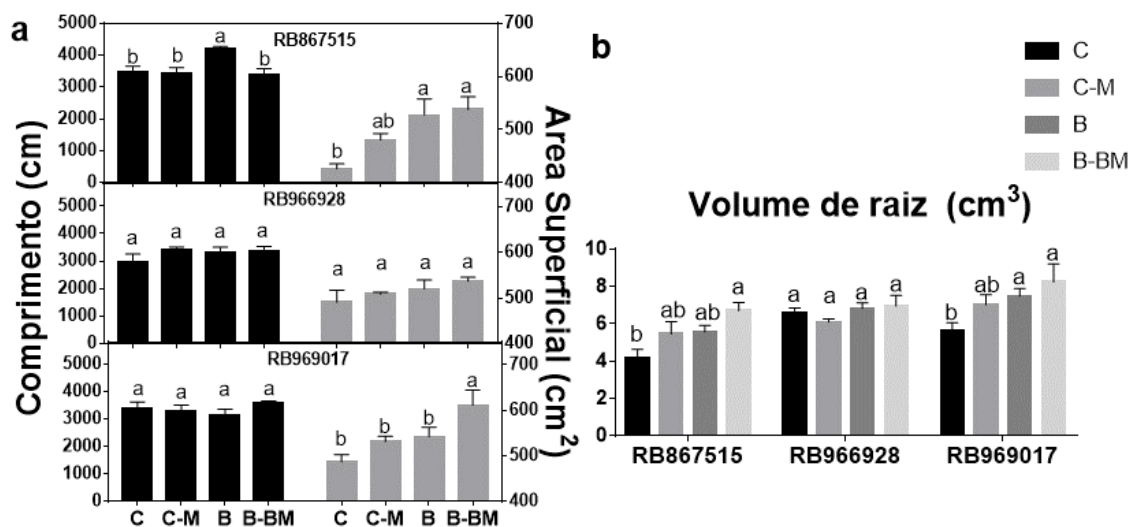
Esses mesmos tratamentos também foram significativos na terceira poda da variedade RB966928, com aumento superior ao controle de 19,20% e 42,30%, respectivamente.

A RB969017 apresentou média superior em sua última poda no tratamento B-BM, com 38,28% maior que o controle (Figura 6.a). De acordo com os dados do número de perfilhos, observou-se que o tratamento bioestimulado (B) aumentou o número de perfilhamento no genótipo RB966928 e promoveu o aparecimento de perfilhos no RB867515. Porém, foi o tratamento (B-BM) no genótipo RB966928 que manteve sua média mais elevada em relação à biomassa de poda e também em relação ao perfilhamento (Figura 6a-b).



**Figura 6.** Massa seca oriunda das três podas realizadas a cada 20 dias durante a formação das mudas (a) e número de perfilhos aos 60 dias de formação das mudas (b), das variedades RB867515, RB966928 e RB969017 sob os tratamentos: Controle (C); controle, inoculado na formação das mudas (C-M); bioestimulado na brotação (B) e bioestimulado na brotação e formação das mudas (B-BM). (\*) Letras maiúsculas comparando cada genótipo por tratamento e letras minúsculas comparando dentro dos genótipos pelo teste LSD ( $P \leq 0,05$ ).

Com relação ao sistema radicular das mudas aos 60 dias, apenas a RB867515 apresentou diferença significativa em relação ao comprimento, com maior média no tratamento (B) que foi 20,49% maior que o tratamento controle (Figura 7a). A RB867515 e RB969017 também apresentaram diferença significativa, quando comparadas com o controle, em relação à área superficial e volume radicular, as maiores médias foram encontradas no tratamento re-inoculadas (B-BM), com incremento de 26,20% e 61,12% para área superficial e volume, na RB867515 e 25,59% e 45,77% na RB969017, respectivamente. A RB966928 não mostrou diferença entre os tratamentos para os parâmetros de raiz analisados (Figura 7a-b).



**Figura 7.** Comprimento e área de superficial da raiz (a) e volume da raiz, (b) em mudas com 60 dias, das variedades RB867515, RB966928 e RB969017 sob os tratamentos: Controle (C); controle, inoculado na formação das mudas (C-M); bioestimulado na brotação (B) e bioestimulado na brotação e formação das mudas (B-BM). (\*) médias com as mesmas letras não diferem pelo teste LSD ( $P \leq 0,05$ ).

De um modo geral, a bioestimulação foi eficiente na formação das mudas em tubetes, principalmente quando há uma nova reintrodução do bioestimulante (tratamento B-BM), notadamente em altura, diâmetro, massa seca da poda, área superficial e volume radicular, no genótipo RB867515 e em diâmetro, podas e perfilhamento na RB966928. Na terceira poda, o uso do bioestimulante incrementou os valores de área superficial da raiz e volume radicular na variedade

RB969017, porém, quando a inoculação ocorre apenas no tubete (tratamento C-M), também apresenta eficiência no crescimento, biomassa e perfilhamento das mudas, sendo este tratamento mais eficiente devido a redução do uso do bioestimulante.

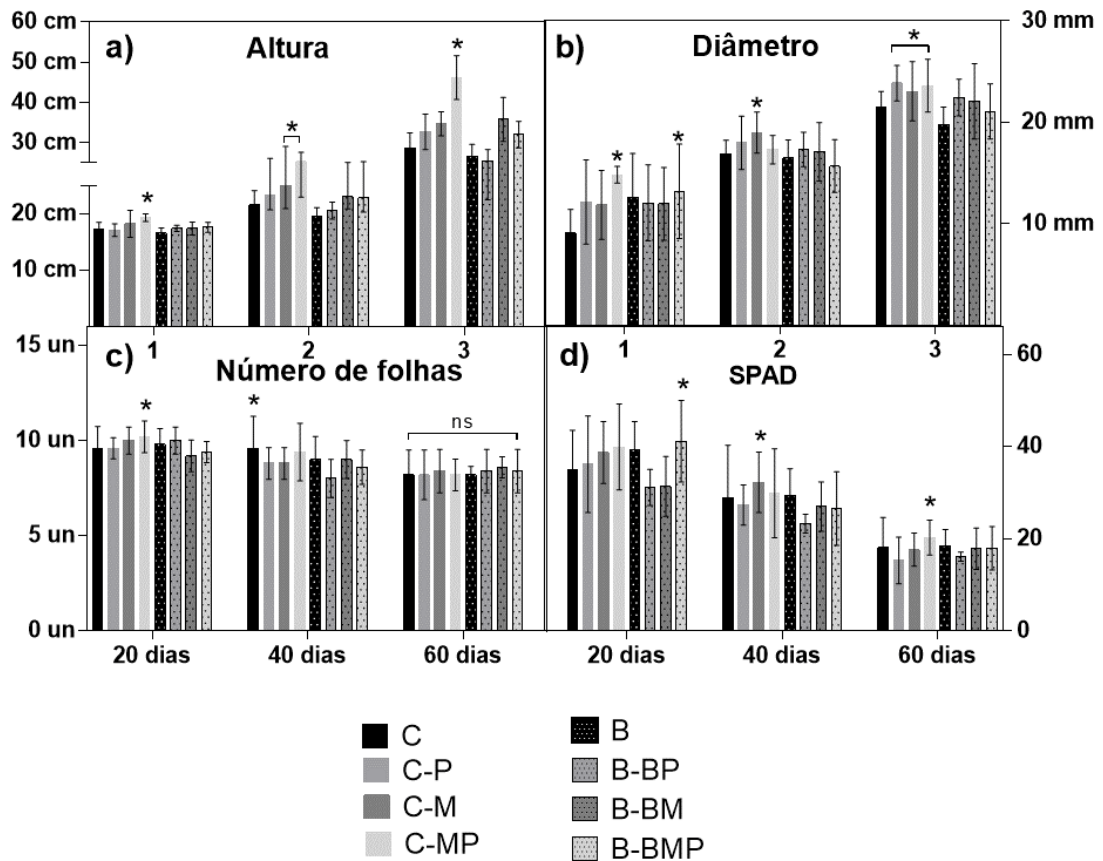
O estudo de Roesch et al. (2005) indica que a inoculação de bactérias diazotróficas não substitui os fertilizantes nitrogenados na cultura de não leguminosas, mas promove melhor absorção e aproveitamento do N disponível no solo. Portanto, os resultados da inoculação em não leguminosas nem sempre mostram resultados favoráveis devido à interação genotípica e fenotípica planta-bactéria e às condições ambientais que são fatores que interferem diretamente no sucesso da inoculação.

Por um lado, as investigações de Matoso et al. (2019) também encontraram resultados semelhantes, a inoculação não apresentou resultados positivos na brotação, mas sua eficiência se deu ao longo da formação das mudas. Por outro, os estudos de Andreote et al. (2014) também enfatizam que fatores bióticos e abióticos interferem no efeito da interação genótipo da planta e inoculação, como o estágio fenológico da planta e ao uso de práticas agrícolas específicas, que interferem nas características físico-químicas do solo.

### 6.3. Efeito do período de aplicação de bioestimulante na fase inicial do plantio da cana-de-açúcar.

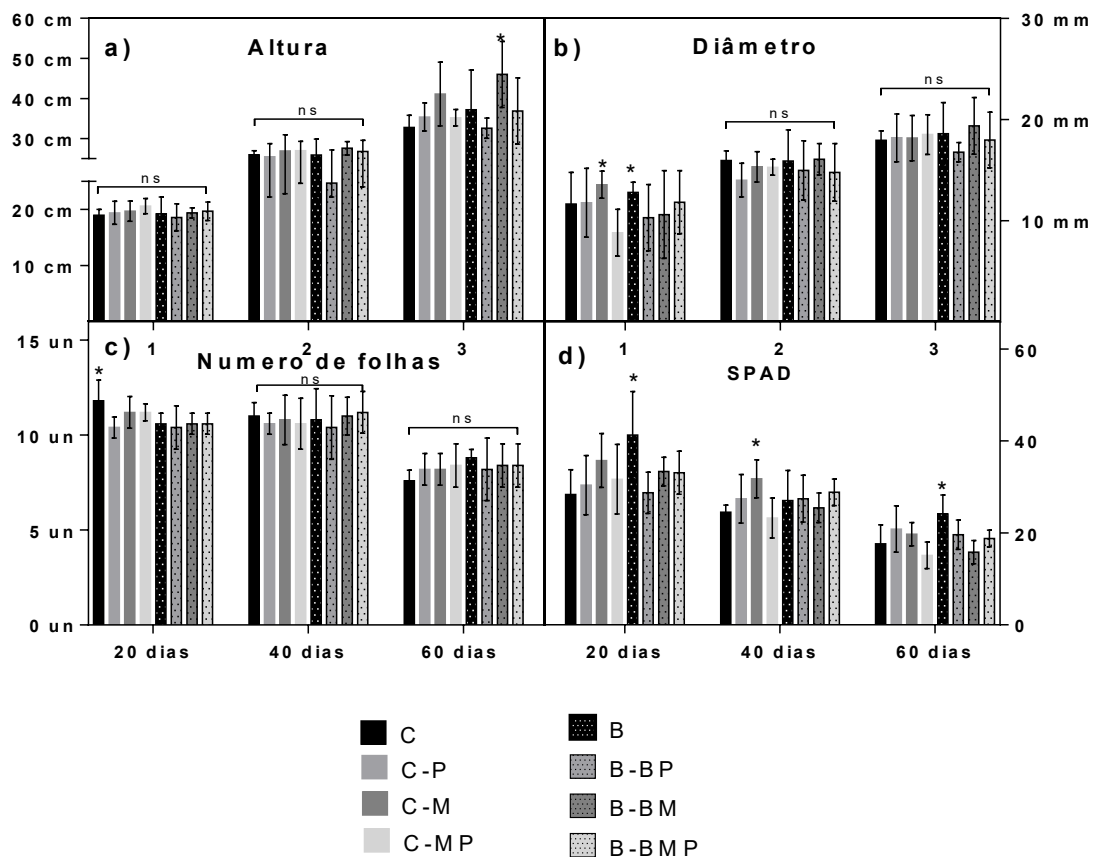
Em relação às características biométricas da variedade RB867515 em ambiente aberto, observou-se que o tratamento com maiores médias em relação aos parâmetros avaliados foi o (C-MP), apresentando superioridade em todas as avaliações de altura de planta, em relação aos demais tratamentos, com médias de 19,3, 25,3, 46,2 cm, ao longo do tempo (Figura 8a) e também apresentou uma das maiores médias em relação ao diâmetro (23,63 mm) e SPAD (20,24) com 60 dias após o plantio (Figura 8b e 8d).





**Figura 8.** Resultados da análise morfológica do RB867515. Altura (a); Diâmetro (b); número de folhas (c) e SPAD (d). ns, \*, Não significativo ou significativo a  $P \leq 0,05$  pelo teste LSD.

A variedade RB966928 apresentou grande variação entre os tratamentos ao longo do tempo. A altura da planta foi maior no tratamento (B-BM) (46 cm) aos 60 dias após o plantio (Figura 9a). Com relação ao número de folhas, no início do plantio, as plantas do tratamento controle foram superiores aos demais tratamentos. No entanto, essa diferença não era mais significativa até o final do experimento (Figura 9c). No índice SPAD, o tratamento (B) foi maior em relação ao controle, aos 20 e 60 dias após o plantio, com médias de 41,26 e 24,10 unidades SPAD, respectivamente (Figura 9d).



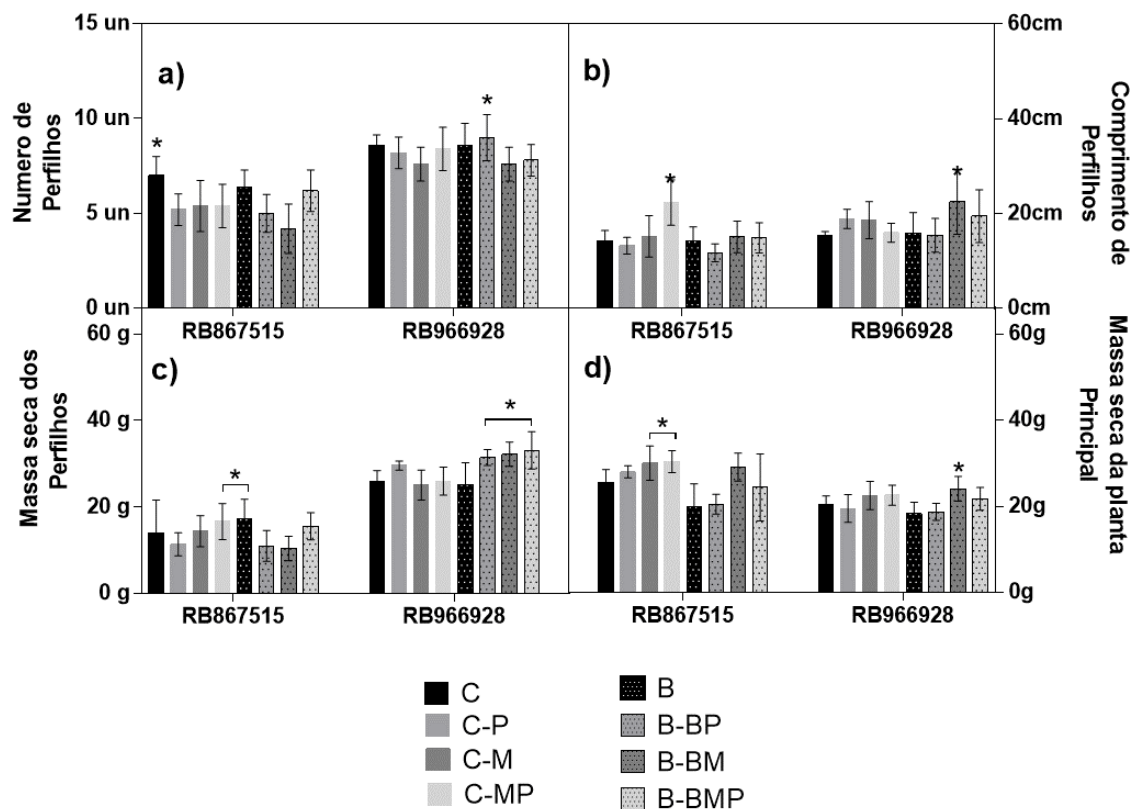
**Figura 9.** Resultados da análise morfológica do RB966928. Altura (a); Diâmetro (b); número de folhas (c) e SPAD (d). ns, \*, Não significativo ou significativo a  $P \leq 0,05$  pelo teste LSD.

Em relação ao perfilhamento, pode-se observar que na variedade RB867515, o tratamento controle foi o que apresentou maior quantidade de perfilhos (Figura 5a), porém, seu tamanho não foi influenciado. O tratamento (C-MP), apesar de não apresentar aumento no número de perfilhos foi o que mais cresceu em tamanho (Figura 5b). Este fato está relacionado ao perfilhamento prematuro, onde a direção era no tamanho em vez do número de perfilhos.

O tratamento controle teve um perfilhamento tardio e aumentou em quantidade e não em tamanho. O mesmo pode ser observado na massa seca de perfilhos (Figura 5c) em que o tratamento (C-MP), juntamente com o tratamento (B), apresentaram médias superiores, e o (B) apresentou comportamento semelhante ao controle, sem aumento de tamanho, mas sim do número de perfilhos. O tratamento (C-MP) também se mostrou eficiente no crescimento da

planta principal, porém, o fato de ter aumentado a biomassa do perfilho não influenciou no seu crescimento (figura 5d).

Na variedade RB966928, o tratamento com maior número de perfilhos e biomassa de perfilhamento foi o B-BP (Figura 10a e 10c). Já o tratamento B-BM respondeu positivamente tanto no tamanho e em massa seca do perfilhamento, quanto na massa seca da planta principal (Figura 10b, 10c e 10d).

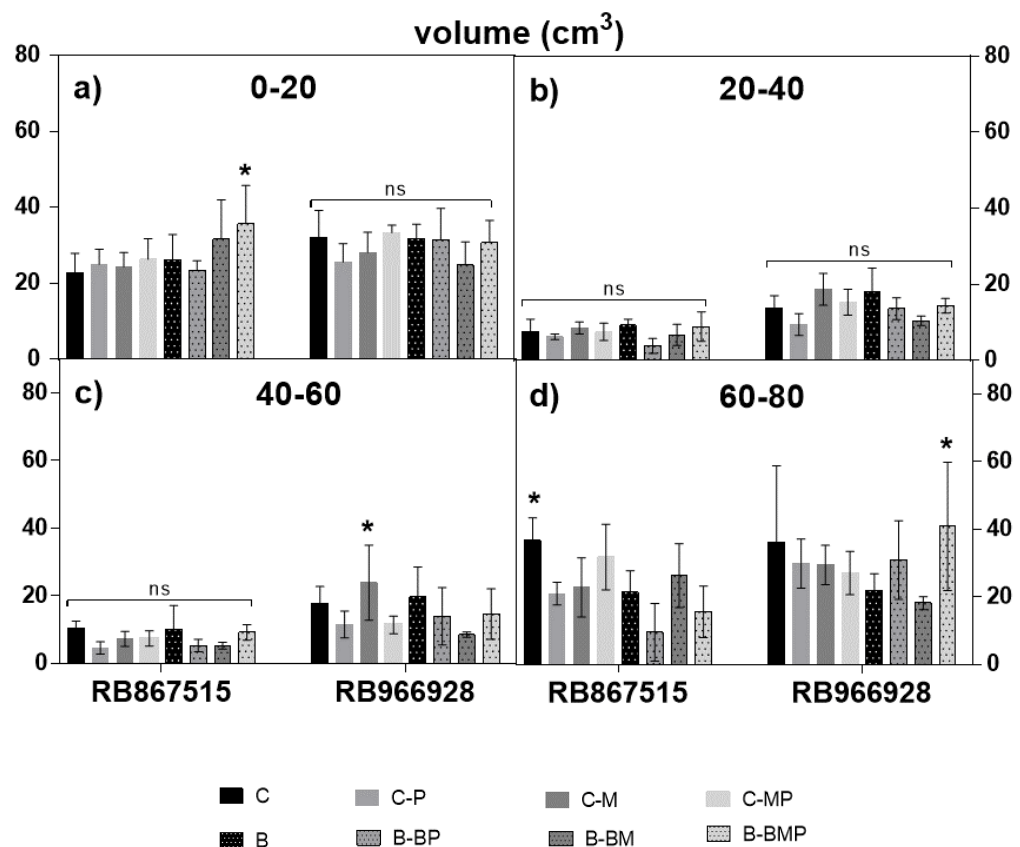


**Figura 10.** Número de perfilhamento (a); comprimento do perfilhamento (b); Dados de perfilhamento de massa seca (c) e principal de massa seca (d) para os genótipos RB867515 e RB966928. ns, \*, Não significativo ou significativo a  $P \leq 0,05$  pelo teste LSD.

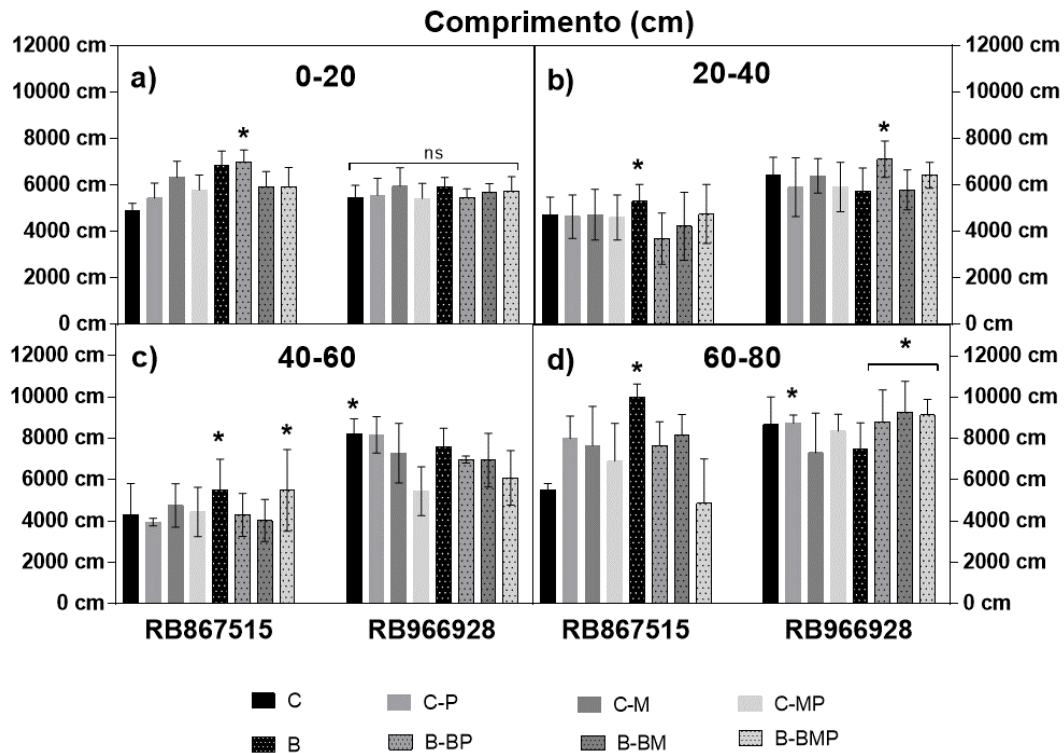
O desenvolvimento das raízes de cada variedade também respondeu de forma diferente aos tratamentos. Em relação ao volume da raiz, a RB867515 apresentou diferença estatística apenas no perfil de 0-20 cm, com o tratamento (B-BMP) superior ao controle em 56,48% e no perfil de 60-80 cm, com o tratamento controle destacado 36,7 cm<sup>3</sup> em média (Figura 11a e 11d).

A RB966928 apresentou diferença de volume de raiz nos perfis de 40-60 cm, sendo o tratamento (C-M) 34,61% superior ao controle. E no perfil de 60-80 cm, o tratamento B-BMP superior ao controle em 12,84%. (Figura 11c e 11d).

Com relação ao comprimento das raízes, o tratamento que apresentou as maiores médias no decorrer dos perfis de solo foi o tratamento bioestimulado na brotação (B), que foi superior ao controle em 39,39, 12,60, 27,60, 82,08% em relação aos perfis 0-20, 20-40, 40-60, 60-80 cm, respectivamente, na variedade RB867515. E o tratamento (B-BP) foi o que mais se destacou no RB966928, sendo superior ao controle em 10,84 e 1,43% nos perfis de 20-40 e 60-80 cm, respectivamente (Figura 12).



**Figura. 11.** Volume da raiz dos genótipos RB867515 e RB966928, perfis do solo 0-20 (a); 20-40 (b); 40-60 (c) e 60-80 (d). ns, \*, Não significativo ou significativo a  $P \leq 0,05$  pelo teste LSD.



**Figura 12 .** Comprimento da raiz dos genótipos RB867515 e RB966928, perfis do solo 0-20 (a); 20-40 (b); 40-60 (c) e 60-80 (d). ns, \*, Não significativo ou significativo a  $P \leq 0,05$  pelo teste LSD.

O efeito da bioestimulação foram mais bem observados na fase inicial de plantio, em ambiente aberto. Mesmo em ambientes considerados ricos em N, a fixação biológica do nitrogênio pode ser importante para compensar as perdas desse nutriente, evitando assim o seu esgotamento nos solos ou substrato (Pons et al., 2007).

As duas variedades avaliadas neste trabalho responderam positivamente à bioestimulação, mas, de maneiras diferentes. A RB867515 apresentou melhor desempenho no tratamento (C-MP), ou seja, este tratamento teve duas inoculações, uma em tubete e outra em campo (Figura 2). Por outro lado, a RB966928 apresentou muitas variações entre os tratamentos ao longo do tempo, mas em geral os tratamentos com destaque foram (B-BM), inoculação na brotação e na formação das mudas e (B-BP), inoculação na brotação e no plantio.

O fato da RB867515 ter dado respostas mais homogêneas pode estar ligada as questões da variedade ser exigente em fertilidade de solo, apresentando melhor desempenho em solos com textura leve e fertilidade média (Ridesa, 2015),

o que justifica sua resposta à inoculação. Essa variedade é considerada uma das mais responsivas à inoculação de bioestimulantes com base em cepas bacterianas que promovem o crescimento, já demonstrado em alguns estudos (Schultz et al. 2012; Pereira et al. 2013; Gírio et al. 2015; Barreto et al. 2019).

Com relação à variedade RB966928 as melhores respostas ocorreram na fase de mudas e no início do plantio, apesar da aplicação também ter sido realizada na brotação, revelando dados interessantes. Tal fenômeno pode ser explicado, pois, a interação de plantas com micro-organismos benéficos no início do desenvolvimento da planta proporciona ainda na fase de viveiro, que as plantas se preparem para o transplante no campo, estimulando o crescimento precoce das mudas e conseqüentemente, reduzindo o tempo de aclimação (Barreto et al. 2019).

De acordo com Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado (2003), há uma diminuição nas populações bacterianas da rizosfera e no interior dos tecidos da cana-de-açúcar ao longo do tempo de seu crescimento, justificando a reaplicação de bioestimulantes durante a ontogenia, conforme realizado no presente estudo.

De acordo com os dados obtidos após a realização desse trabalho sugere-se que duas aplicações do bioestimulante são necessárias visando o incremento de parâmetros relacionados ao crescimento e desenvolvimento da variedade de cana-de-açúcar. Na RB867515, aplicação na formação de mudas e no plantio (C-MP) e na RB966928, sendo recomendada uma aplicação na brotação e posteriormente nas mudas (B-BM) e/ou na brotação e no plantio (B-BP). Esses resultados são importantes, pois as plantas inoculadas com bactérias com capacidade e eficiência de fixar o nitrogênio atmosférico, reduzem o uso de fertilizantes nitrogenados e ajudam a fornecer nitrogênio para aumentar e sustentar a produção da cana-de-açúcar sem agredir o meio ambiente (BARRETO et al. 2019).

Nesse sentido esse trabalho fez o estreitamento em relação ao uso do bioestimulante a base de bactérias e ácidos húmicos. Apesar do uso já ser bem difundido na cana-de-açúcar (Da Silva et al. 2017) e em diversas outras culturas como milho (Canellas et al. 2012) e tomate (Olivares et al. 2015). Mas, o momento ideal da aplicação e quantas aplicações necessárias ao longo da vida da cultura ainda deixavam dúvidas.

## 7. CONCLUSÕES

- A aplicação do bioestimulante não influenciou a porcentagem e a velocidade de brotação de três dos quatro genótipos testados. Apenas RB036066 apresentou aumento positivo na bioestimulação em 10% em relação ao controle.
- Na fase de formação da muda, os tratamentos de inoculação e reinoculação do bioestimulante mostraram-se eficientes em dois genótipos testados, RB867515 e RB966928. Já a RB969017 apresentou incremento superior ao controle no tratamento Reinoculado em 38,28%; 25,59% e 45,77% nas características massa seca da poda, área superficial e volume de raízes, respectivamente.
- No desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar em ambiente aberto, os tratamentos mais eficientes foram: (C-MP) na RB867515 e os tratamentos (B-BM) e (B-BP) na RB966928. Portanto, duas inoculações são necessárias ao longo da ontogenia da planta. Para a RB867515 o ideal é que uma inoculação ocorra durante a formação das mudas e outra inoculação no plantio. Já o RB966928 apresentou eficiência na inoculação, na brotação dos mini-toletes. Apesar de não afetar no início da brotação, foi a que apresentou melhores respostas no desenvolvimento futuro da planta, quando associada a uma segunda inoculação.

## 8. RESUMO E CONCLUSÕES

Para que haja uma otimização do rendimento da cana-de-açúcar (*Saccharum* híbrido), a recomendação técnica sugere que 20% do canavial sejam renovados anualmente (Matoso et al., 2017). Nesse sentido, a tecnologia de mudas pré-brotadas (MPB), vem sendo cada vez mais utilizadas nas reformas de canaviais (Landell et al., 2012). Essa tecnologia aliada com a aplicação de bioestimulantes vem crescendo, no entanto, ainda restam algumas dúvidas em relação ao momento ideal para ocorrer à inoculação e sobre a variabilidade genotípica influenciando na magnitude de resposta. Nesse sentido, objetivou-se com esse trabalho conhecer as respostas de diferentes genótipos de cana-de-açúcar quando associadas à aplicação de bactérias benéficas e ácidos húmicos, nas diferentes ontogênias da planta. Portanto, foram desenvolvidos três experimentos interligados, inoculando e reinoculando o bioestimulante composto das bactérias (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54, *H. rubrisubalbicans* HCC103 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5) suspensas em ácidos húmicos, extraído



de torta de filtro de cana-de-açúcar, na dosagem de 48 mg de C.L<sup>-1</sup>. As variedades de cana utilizadas foram: RB867515, RB966928, RB969017 e RB036066. No primeiro experimento, os tratamentos foram com ou sem a imersão dos mini-toletes no bioestimulante. No segundo experimento as variedades RB867515, RB966928 e RB969017 foram selecionadas e transplantadas em tubetes e receberam no plantio 10 mL do bioestimulante e o controle recebeu água, ficando assim os tratamentos: C (controle); B (bioestimulado na brotação); C-M (controle, inoculado nas mudas) e B-BM (bioestimulado, inoculado na brotação e nas mudas). No terceiro experimento as RB867515, RB966928 foram conduzidas ao plantio em ambiente aberto, onde foi realizada uma nova inoculação, com 200 mL/planta de bioestimulante e o controle recebeu apenas água, ficando assim oito tratamentos: C (controle); C-P (controle, inoculado no plantio); C-M (controle, inoculação nas mudas); C-MP (controle, inoculação nas mudas e no plantio); B (bioestimulado na brotação); B-BP (bioestimulado, na brotação e no plantio); B-BM (bioestimulado, na brotação e nas mudas) e B-BMP (bioestimulado, na brotação, nas mudas e no plantio). Foram feitas avaliações de brotação (no primeiro experimento) assim como avaliações agrônomicas durante a formação das mudas e durante o desenvolvimento inicial das plantas. Inicialmente a aplicação do bioestimulante influenciou a variedade RB036066 que apresentou incremento positivo em 10% em relação ao controle. Na formação das mudas os tratamentos de inoculação e reinoculação do bioestimulante se mostraram eficiente em dois genótipos testados na RB867515 e RB966928. No terceiro experimento, os mais eficientes foram: o tratamento C-MP na RB867515 e os tratamentos B-BM e B-BP na RB966928. Portanto, duas inoculações são necessárias ao longo da ontogenia da planta. Para a RB867515 o ideal é que uma inoculação ocorra durante a formação das mudas e outra inoculação no plantio. E a RB966928 apresentou eficiência na inoculação, na fase de brotação dos mini-toletes, apesar de não afetar no início da brotação foi a que apresentou melhores respostas no desenvolvimento futuro da planta, quando associada a uma segunda inoculação. Embora o tratamento de bioestimulação não se mostrasse favorável no início da brotação, para alguns genótipos sua eficiência se deu ao longo do processo de formação das plantas, por isso, a importância da observação ao longo do seu desenvolvimento vegetativo.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aguiar, N.O., Olivares, F.L., Novotny, E.H., Canellas, L.P. (2018) Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. *PeerJ*, 2018 (9):1–28.
- Andreote, F.D., Gumiare, T., Durrer, A. (2014) Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, 12:528–539.
- 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. *Functional Plant Biology*, 29(4):417–423.
- Barral, U.M. (2015) *Efeito de fontes e doses de ácidos húmicos na produção do feijão (Phaseolus Vulgaris L.)*. Dissertação (mestrado em Produção Vegetal) - Diamantina - MG, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM, 61p.

- Barreto, M.C.S., Figueiredo, M.V.B., Silva, M.V., De Oliveira, J. De P., Andrade, A.G., Almeida, C.M.A., Junior, M.U.F., Santos, C.E.R.S., Reis Junior, O.V., Lima, V.L.M. (2019) Inoculation of endophytic diazotrophic bacteria in micropropagated seedlings of sugarcane (*Saccharum officinarum* sp.). *Environmental Sustainability*, 2 (1):5–12.
- Ben, B.E.N. (2017) Balanço Energético nacional 2017: Ano base 2016. Empresa de Pesquisa Energética - EPE, Rio de Janeiro, 292p.
- Canellas, L.P., Balmori, D.M., Médici, L.O., Aguiar, N.O., Campostrini, E., Rosa, R.C.C., Façanha, A.R., Olivares, F.L. (2012) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant and Soil*, 366:119–132.
- Canellas, L.P., Santos, G.DeA. (2005). *Humosfera: Tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, 310p.
- Chaves, V.A., Dos Santos, S.G., Schultz, N., Pereira, W., Sousa, J.S., Monteiro, R.C., Reis, V.M. (2015) Desenvolvimento Inicial de Duas Variedades de Cana-de-Açúcar Inoculadas com Bactérias Diazotróficas. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 39 (6):1595–1602.
- CONAB. (2019) Observatório Agrícola: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2019/20. Primeiro levantamento. Maio/2019, 6:1-58.
- CONAB. (2020) Observatório Agrícola: Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2019/20. Terceiro levantamento. Dezembro/2020, 7:1–62.
- Da Silva, M.F., Antônio, C.S., De Oliveira, P.J., Xavier, G.R., Rumjanek, N.G., Soares, L.H.B; Reis, V.M. (2012) Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil*, 356:231–243.

- Da Silva, S.F., Olivares, F.L., Canellas, L.P. (2017) The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4:1-24.
- Da Rosa, C.M., Castilhos, R.M.V., Vahl, L.C., Castilhos, D.D., Pinto, L.F.S., Oliveira, E.S., Leal, O. DOS A. (2009) Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 33 (4):959–967.
- Daros, E., De Oliveira, R.A., Zambon, J.L.C., Bepalhok Filho, J.C., Brasileiro, B.P., Ido, O.T., Ruaro, L., Weber, H. (2018) RB036066 – A sugarcane cultivar with high adaptability and yield stability to Brazilian South-central region. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 18 (3):325–329.
- De Oliveira, H.P., Melo, R.O, Baldotto, M.A, Andrade, M.A, Baldotto, L.E.B (2018) Performance of pre-sprouted sugarcane seedlings in response to the application of humic acid and plant growth-promoting bacteria. *Semina:Ciencias Agrarias*, 39 (3):1365–1370.
- Döbereiner, J. (1953) Azobacter em solos acidos. *Biological Institute Ecology Experimental Agriculture*, 11:1–36.
- Ferreira, D.F. (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, 35 (6):1039–1042.
- Fuentes-Ramirez, L.E., Jimenez-Salgado T., Abarca-Ocampo I.R., Caballero-Mellado, J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugar cane cultivars of Mexico. *Plant Soil*. 154:145-150.
- Gírio, L.A.S., Dias, F.L.F., Reis, V.M., Urquiaga, S., Schultz, N., Bolonhezi, D., Mutton, M.A. (2015) Bactérias promotoras de crescimento e adubação

nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 50 (1):33-43.

Hardoim, P.R., Overbeek, L.S.V., Elsas, J.D.V. (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 16 (10):463–471.

Jurandy, E., Nogueira, B., Andreote, F.D. (2016) *Microbiologia do solo*, 221p.

Landell, M.G.A., Campana, M.P., Figueiredo, P., Xavier, M.A., Anjos, I.A., Dinardo-Miranda, L.L., Scarpari, M.S., Garcia, J.C., Bidóia, M.A.P., Silva, D.N., Mendonça, J.R., Kanthack, R.A.D., Campos, M.F., Brancalião, S.R., P.E.M. (2012) Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. *Documentos, IAC, Campinas*, 109:1-16.

Lopes, I., SILVA, J.A.B., Simoes, W.L., Barros, E.S.C., Nascimento, F.M.F. do, Amotim, M.N. (2020) Formas De Aplicação De Bioestimulante Na Produção Da Cana-De-Açúcar. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada*, 14 (1):3823–3834.

Maguire, J.D. (1962) Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2:176–177.

Marques Júnior, R.B., Canellas, L.P., Da Silva, L.G, Olivares, F.L (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 32 (3):1121–1128.

Matoso, E.S., Donini, L., Mascarenhas, L.S., Fehrenbach, G.W, Varnes, L.S., Silva, S.D.A. (2017) Multiplication of sugarcane seedlings and effect of inoculation of diazotrophic bacteria during an in vitro rooting phase. *Revista Congrega URCAMP (CD-ROM)*. 14:2096-2109.

- Matoso, E.S., Reis, V.M., Giacomini, S.J., Silva, M.T., Avancini, A.R., Silva, S.D.A. (2019) Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. *Scientia Agricola*, 78 (1):1–9.
- Maule, R.F., Mazza, J.A., Martha JR., G.B. (2001) Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. *Scientia Agricola*, 58 (2):295–301.
- May, A., Ramos, N.P. (2019) Uso de gemas individualizadas de cana-de-açúcar para a produção de mudas. *Embrapa Meio Ambiente - Circular Técnica (INFOTECA-E)*, 29 (1):1–19.
- Muñoz-Rojas, J., Caballero-Mellado, J. (2003) Population Dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Sugarcane Cultivars and Its Effect on Plant Growth. *Microbial Ecology*, 46 (4):454–464.
- Olivares, F.L., Aguiar, N.O., Rosa, R.C.C., Canellas, L.P. (2015) Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth-promoting bacteria and humic substances boost production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183 (1):100–108.
- Pereira, W., Leite, J.M., Hipólito, G.S., Santos, C.L.R., Reis, V.M. (2013) Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas, 2:363–370.
- Pons, T.L., Perreijn, K., Kessel, C.V., Werger, M.J.A. (2007) Symbiotic nitrogen fixation in a tropical rainforest: <sup>15</sup>N natural abundance measurements supported by experimental isotopic enrichment. *New Phytologist*, 173 (1):154–167.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99 (4):1271–1274.
- RIDESA, (2010) Catálogo Nacional de Variedade “RB” de Cana-de-Açúcar. 136p.

- RIDESA, (2015) 45 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 25 anos de Ridesa. 1. ed. Curitiba: 156p.
- RIDESA, (2020) Censo Varietal - 2020 Estados de São Paulo e Mato do Grosso do Sul 122 usinas colaboradoras, 2p.
- Robinson, N., Vogt, J., Lakshmanan, P., Susannet, S. (2016) Nitrogen physiology of sugarcane. *In: Moore, P.H., Botha, F.C. Sugarcane: physiology, biochemistry & functional biology* 6 ed: Hoboken: Wiley, p. 169–195.
- Rodrigues Neto, J., Malavolta J.R., V.A., Victor, O. (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathologica*, 12:1–16.
- Roesch, L.F., Camargo, F.O., Selbach, P.A., Sá, E.S. (2005) Reinoculação de bactérias diazotróficas aumentando o crescimento de plantas de trigo. *Ciência Rural*, 35 (5):1201–1204.
- Schultz, N., De Moraes, R.F., Da Silva, J.A., Baptista, R.B., Oliveira, R.P., Leite, J.M., Pereira, W., Carneiro Júnior, J.B., Alves, B.J.R., Baldani, J.I., Boddey, R.M., Urquiaga, U., Reis, V.M. (2012) Avaliação agrônômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47 (2):261–268.
- Schultz, N., Pereira, W., De Albuquerque Silva, P., Baldani, J.I., Boddey, R.M., Alves, B.J.R., Urquiaga, S, Reis, V.M. (2017) Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. *Plant Production Science*, 20 (4):366–374.
- Schultz, N., Reis, V.M., Urquiaga, S. (2015) Resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada: fontes nitrogenadas, formas de aplicação, épocas de aplicação e efeito varietal. *Embrapa Agrobiologia*, 298:1-52.

Silva, I.R., Mendonça, E.S. (2007) Matéria orgânica do solo. *Fertilidade do solo*, 1:275–374.

Verma, S.C., Ladha, J.K., Tripathi, K. (2001) Evaluation of plant growth-promoting and colonization ability of endophytic diazotrophic from deepwater rice. *Journal of Biotechnology*, 91:127- 141.