

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E RECUPERAÇÃO DE
FERTILIZANTE NITROGENADO EM CANA-DE-AÇÚCAR
INOCULADA COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA PRESENÇA
DE ÁCIDOS HÚMICOS

SILÉZIO FERREIRA DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO – 2017

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E RECUPERAÇÃO DE
FERTILIZANTE NITROGENADO EM CANA-DE-AÇÚCAR
INOCULADA COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA PRESENÇA
DE ÁCIDOS HÚMICOS

SILÉZIO FERREIRA DA SILVA

“Dissertação 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 Mestre em Produção Vegetal”.

Orientador: Prof. Luciano Pasqualoto Canellas

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF

038/2017

S586 Silva, Silézio Ferreira da.

Promoção do crescimento e recuperação de fertilizante nitrogenado em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas na presença de ácidos húmicos / Silézio Ferreira da Silva – Campos dos Goytacazes, RJ, 2017.

60 f. : il

Bibliografia: f. 55 - 60

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, 2017.

Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.

1. Bioestimulantes. 2. Isótopo. 3. Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. 4. Cana-de-açúcar. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD – 633.61

PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO E RECUPERAÇÃO DE
FERTILIZANTE NITROGENADO EM CANA-DE-AÇÚCAR
INOCULADA COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS NA PRESENÇA
DE ÁCIDOS HÚMICOS

SILÉZIO FERREIRA DA SILVA

“Dissertação 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 Mestre em Produção Vegetal”.

Aprovada em 31 de março 2017

Comissão Examinadora:

Prof. Fábio Lopes Olivares (Ph.D., Ciência do solo) – UENF

Willian Pereira (D.Sc., Ciência do Solo) - UFRRJ

Prof. Alessandro Coutinho Ramos (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF

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

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente.

Aos meus pais, Antônio e Madalena, pelo apoio e dedicação.

Aos meus irmãos, José Carlos, Maria Lúcia, Leila e Fabiano, pelo apoio e incentivo, em especial, à Maria Lúcia.

À minha namorada, Thaís Ferreira Gomes, pelo amor e carinho.

Aos meus amigos de faculdade, Diego “Boy” e Paulo “Manolo”.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e colaboração, Aminthia, Keiji “Japonês”, Isaac, Lívia, Kamilla, Natália, Poliana e Jucimara.

Ao Willy Pedro Vasconcellos Prellwitz e à Fazenda Abadia, pelo apoio na realização dos experimentos.

Aos meus orientadores, Luciano Canellas e Fábio Olivares.

À capes, pelo incentivo da bolsa de pós-graduação. E ao Projeto FINEP Pluricana.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL	v
GENERAL ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Efeitos das substâncias húmicas na promoção do crescimento vegetal	4
2.2 A importância das bactérias diazotróficas endofíticas para plantas não leguminosas.....	6
2.3. O uso de bioestimulantes à base de substâncias húmicas e bactérias promotoras do crescimento vegetal	7
2.4 Métodos de aplicação de bactérias promotores do crescimento vegetal em plantas	10
3. CAPÍTULO 1	12
APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA PRESENÇA DE ÁCIDOS HÚMICOS EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	12
Resumo	12
Abstract.....	14
1. Introdução.....	15
2. Material e métodos	16
2.1Localização, tipo de solo e manejo da adubação	16
2.2 Obtenção do inóculo, dos ácidos húmicos e preparo do bioestimulante ..	18
2.3 Experimento em fatorial utilizando blocos casualizados em parcelas subdivididas.....	19
2.4 Experimento em faixas	20

2.5 Análises dos experimentos.....	20
2.6 Análise estatística.....	20
3. Resultados.....	21
4. Discussão	29
5. Conclusões	32
6. Referências.....	32
CAPÍTULO 2	36
EFICIÊNCIA DA RECUPERAÇÃO DE NITRATO ($K^{15}NO_3$) EM FUNÇÃO DA APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA PRESENÇA DE ÁCIDOS HÚMICOS EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	36
Resumo	36
Abstract.....	37
1.Introdução.....	38
2. Material e métodos	39
3. Resultados.....	42
4. Discussão	49
5. Conclusões.....	50
6. Referências.....	51
4. CONCLUSÕES	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

RESUMO GERAL

SILVA, SILÉZIO. F, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Março de 2017. Promoção do crescimento e recuperação de fertilizante nitrogenado em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas na presença de ácidos húmicos. Orientador: Luciano Pasqualoto Canellas.

A utilização de bioestimulante à base de substâncias húmicas (SH) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) podem aumentar a produção de colmos em cana-de-açúcar, por meio tanto da promoção do crescimento vegetal como do aumento na eficiência de uso de nitrogênio (N). Nesse sentido, foram realizados dois experimentos independentes a campo e um em casa de vegetação com os seguintes objetivos: (i) avaliar a melhor forma e época de utilizar o bioestimulante formulado à base de BPCV, na presença de ácidos húmicos (AH) e (ii) avaliar a eficiência da recuperação de N em cana-de-açúcar. No primeiro experimento realizado em lavoura comercial, foi comparada a aplicação do bioestimulante no sulco de plantio e em pulverização foliar, sendo testadas três épocas diferentes: 60, 90 e 60+90 dias após a emergência, comparadas com o tratamento controle sem aplicação do bioestimulante em cana planta. Nas duas socas subsequentes avaliou-se somente aplicação foliar do bioestimulante aos 60 dias após a emergência. Foi observado na cana planta que a aplicação no sulco de plantio não proporcionou ganho em produção de colmos quando comparado ao controle sem inoculação. A aplicação foliar aos 60 dias após a emergência proporcionou um aumento de 36% em relação ao controle. Na primeira soca não foi observado efeito

dos tratamentos inoculados em relação ao controle. Este resultado foi interpretado como consequência da seca severa ocorrida na região durante o período de crescimento da cana-de-açúcar. Na segunda soca, com o regime regular de chuvas, foi observado novamente aumento de 24% na produtividade em relação ao controle com a aplicação foliar do bioestimulante aos 60 dias após a emergência. No segundo experimento de campo, foi avaliada a aplicação foliar tratorizada do bioestimulante, aos 60 dias após a emergência da primeira soca. Foi observado que aplicação do bioestimulante proporcionou incrementos de 19 e 16% na produção de colmos em comparação com o tratamento controle em duas socas consecutivas, respectivamente. Nos experimentos de campo não foram observadas alterações na qualidade industrial da cana avaliada pelo teor de sólidos solúveis. No experimento em casa de vegetação, foi avaliada a aplicação de AH e BPCV aplicados isoladamente ou em conjunto. Foi utilizado N na forma de nitrato de potássio ($K^{15}NO_3$), aplicado no vaso de cultivo para avaliação da eficiência de recuperação de N. Foram observados incrementos significativos na massa fresca e seca da cana-de-açúcar, além de aumento no conteúdo de N na parte aérea nas plantas tratadas com AH e BPCV, tanto isoladamente como em conjunto. A aplicação isolada de AH promoveu aumento de 17,44% na recuperação de N na raiz. Tomados em conjunto, os resultados dos experimentos de campo e de casa de vegetação permitiram concluir que (i) a aplicação foliar do bioestimulante foi mais eficiente que a aplicação no sulco e proporcionou incrementos na produção de colmos sem modificar as características industriais da cana-de-açúcar; (ii) a melhor época de aplicação foi aos 60 dias após a emergência; (iii) o uso do bioestimulante à base de SH e BPCV não aumentou a eficiência da recuperação de N fertilizante e a promoção do crescimento vegetal observada pode ser atribuída a outros fatores, entre eles, alterações metabólicas e fixação biológica de nitrogênio. A utilização de AH e BPCV na cultura da cana-de-açúcar é uma estratégia viável que promoveu ganhos na produção de colmos, além de aumento na recuperação de N.

Palavras-chave: bioestimulante, isótopo, BPCV, AH.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, SILÉZIO. F, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. March de 2017. Growth Promotion and recovery of niitrogen fertilizer in sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria in the presence of humic acids. Advisor: Luciano Pasqualoto Canellas.

Use of biostimulant based on humic substances (HS) and plant growth-promoting bacteria (PGPB) may increase sugarcane stalk production by both plant growth promotion and nitrogen (N) use efficiency. Thus, two independent field experiments and one in the greenhouse were conducted with the following objectives: (i) evaluate the better way and time to applicate a biostimulant formulated by PGPB in the presence of humic acids (HA) and (ii) evaluate the efficiency of N recovery in sugarcane. In the first field experiment, which was conducted at commercial sugarcane plantation, biostimulant application in grooves and foliar spray methods were compared, being tested three different times: 60, 90 and 60+90 days after emergence compared to control treatment without biostimulant application in plant cane. In the two subsequent sugarcane ratoon, just foliar application of the biostimulant 60 days after emergence was evaluated. Concerning plant cane, it was observed that groove application did not increase stalk production compared with non-inoculated control plants. Foliar application 60 days after emergence improved an increase of 36% in productivity over the control. In the first ratoon, no significant effect was noted in inoculated treatments compared to control. This result was

interpreted as a consequence of the severe drought occurred during sugarcane growth in this region. In the second ratoon, with regular rainfall regime, foliar application of biostimulant 60 days after emergence increased 24% in productivity compared to control. In the second field experiment, the foliar application of biostimulant with a tractor 60 days after cutting was evaluated. It was observed that biostimulant application increased 19 and 16% in stalk production compared to control treatment in two consecutive ratoon, respectively. Soluble solids analysis revealed no changes in industrial quality of sugarcane in field experiments. In the greenhouse experiment, sole or combined application of HA and PGPB was evaluated. In order to evaluate efficiency of N recovery, potassium nitrate ($K^{15}NO_3$) as N source was applied in culture vessels. Significant increases in fresh and dry sugarcane biomass, as well as increase in shoot N content in plants treated with HA and PGPB by both sole and combined application. Sole application of HA improved 17,44% of N recovery in root. Together, results from both field and greenhouse experiments allowed conclude that (i) the foliar application of biostimulant is more efficient than groove application and provided increases in stalk production without modifying industrial sugarcane characteristics; (ii) the better time for application was 60 days after emergence; (iii) the use of biostimulant based on HA and PGPB did not increase the efficiency of N fertilizer recovery and the plant growth promotion observed should be attributed to other factors, such as metabolic changes and biologic nitrogen fixation. The use of HA and PGPB in sugarcane crop is a promising strategy which improved increases in stalk production and N recovery.

Keywords:biostimulant, isotope, PGPB, HA.

1. INTRODUÇÃO

A fundamentação da revolução verde ocorrida principalmente entre 1960 e 1970, cujos princípios são aplicados até hoje, é aumentar a produção agrícola por meio do uso da monocultura de plantas melhoradas e uso intensivo de insumos químicos industriais, água e outros recursos naturais aliados à mecanização do solo e de outras práticas agrícolas.

Dentre as consequências da revolução verde têm-se os impactos negativos ao meio ambiente: degradação dos solos, depauperamento das principais reservas minerais e hídricas, perda da biodiversidade, entre outras. A população sofre consequências como a contaminação pelo uso excessivo de agrotóxicos. Além disso, a revolução verde trouxe também consequências no plano social acarretando esvaziamento do campo como êxodo rural e a concentração da posse da terra. De acordo com a FAO (2012), a produção de grãos no mundo aumentou cerca de três vezes de 1970 a 1990, enquanto que a população com fome (aquela que vive com menos de um dólar por dia) aumentou de 100 para 800 milhões.

Diante de tais fatos e da crescente necessidade de produção de alimentos, fibras e biocombustíveis, fica evidente a necessidade de mudança desse modelo de agricultura. Pois é preciso preservar o meio de produção e conservar os recursos naturais para que os mesmos possam ser utilizados pelas gerações futuras.

Para que essas mudanças ocorram é necessário reformular o conjunto de técnicas aplicadas na produção agrícola, gerando novos modelos de agricultura de base ecológica, porém produtivos. Também, é necessário que haja uma

reformulação nas escolas de Agronomia, com intuito de formar profissionais capacitados a implementar tais mudanças, assim como a formulação de políticas públicas (financiamento de longo prazo a juros baixos) que incentivem os agricultores a produzirem de forma sustentável.

O desenvolvimento de processos biotecnológicos pode ser à base dos modelos de produção ecologicamente intensivos que visem contribuir para o grande desafio de produzir sem causar o esgotamento dos recursos não renováveis.

As substâncias húmicas (SH) são utilizadas como veículo de introdução de microrganismos diazotróficos endofíticos em sistemas de produção agrícola. Este processo biotecnológico surge como uma alternativa de baixo custo e, ambientalmente, correta para aumentar a eficiência do uso de nutrientes (CANELLAS et al., 2013).

A maior parte da matéria orgânica de solos, águas e sedimentos é formada pelas substâncias húmicas (SH) que condicionam as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, além de apresentar reconhecido efeito sobre o metabolismo das plantas (NARDI et al., 2009).

O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) como bioestimulante é uma alternativa utilizada para melhorar o rendimento médio de culturas vegetais. As BPCV apresentam mecanismos associados à promoção do crescimento vegetal como a fixação biológica do nitrogênio (FBN), que é um processo com alto potencial de aplicação na agricultura. Este processo biológico possibilita reduções nos custos de produção e de utilização de insumos químicos, e minimizam os impactos ambientais. As BPCV também auxiliam na produção de fitohormônios como auxina (Fuentes-Ramirez et al., 1993), controle biológico de pragas e doenças em plantas, além da solubilização de fosfato e zinco inorgânico (VERMA et al., 2001).

O uso de BPCV em conjunto com as SH tem demonstrado bons resultados em casa de vegetação em plantas não leguminosas, porém, a campo, a variabilidade dos resultados constitui uma limitação e seu uso ainda está distante do observado com o rizóbio. Possíveis avanços na tecnologia de uso das BPCV terão grande repercussão econômica e social.

Algumas dúvidas básicas sobre a utilização de BPCV em cana-de-açúcar ainda persistem. Por exemplo, inicialmente a Embrapa Agrobiologia recomendava

a imersão de colmos em tanques com BPCV antes do plantio. Em função da inviabilidade dessa prática em larga escala, foi recomendada a aplicação do inoculante líquido no sulco de plantio. Porém, a aplicação via foliar não seria mais eficiente? Além disso, o principal mecanismo de estimulação do crescimento vegetal pelo uso em conjunto de SH e BPCV seria a FBN ou a promoção do sistema radicular?

O trabalho existe sobre a hipótese de que o uso combinado de AH e BPCV proporciona aumento na produção de cana-de-açúcar e contribui na recuperação de nitrogênio.

O objetivo do trabalho é (i) avaliar a melhor forma e época de utilizar um bioestimulante à base de BPCV na presença de AH em cana-de-açúcar e (ii) quantificar a recuperação de nitrogênio em cana-de-açúcar em função da inoculação de BPCV na presença ou ausência de AH, pelo método da diluição isotópica de $\delta^{15}\text{N}$.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeitos das substâncias húmicas na promoção do crescimento vegetal

As SH compreendem a maior parte da matéria orgânica de solos, água e sedimentos e podem influenciar tanto na fisiologia quanto no metabolismo das plantas. Quando em solução, podem ser consideradas como uma mistura complexa, contendo milhares de moléculas individuais em arranjo supramolecular, variando na estrutura, funcionalidade e reatividade (NEBBIOSO & PICCOLO, 2014).

As SH possuem a capacidade de estimular o crescimento e a produtividade das plantas. Alguns fatores influenciam o efeito das SH no desenvolvimento das plantas, tais como, a fonte de obtenção do material, as doses utilizadas, a forma como é aplicada, o tipo de natureza química do material, a espécie e idade do vegetal estudado (VAUGHAN & MALCOLM, 1985).

As SHs, geralmente, são obtidas para fins comerciais de fontes não renováveis como turfeiras e rochas sedimentares (lignita). Uma alternativa viável é a obtenção de substâncias do tipo húmicas de fontes renováveis como compostagem e vermicompostagem de diferentes resíduos orgânicos.

O uso de SH provenientes de vermicomposto promoveu o desenvolvimento radicular de plântulas de milho e a ativação da H⁺-ATPase. Estas são enzimas transmembranares capazes de hidrolisar ATP, gerando energia e gradiente eletroquímico, que estão relacionados com a absorção de macro e micronutrientes (CANELLAS et al., 2002).

Além disso, as SH influenciam na plasticidade da parede celular ao acidificar o apoplasto, tal fato é importante no processo de crescimento e alongamento da célula vegetal e está relacionado com a teoria do crescimento ácido. Essa teoria postula que o aumento da extrusão de prótons mediado pela H⁺-ATPase promove a acidificação do apoplasto, que por sua vez ativa enzimas específicas que atuam sobre a parede celular, aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (RAYLE & CLELAND, 1992)

As SH influenciam no aumento e na eficiência de absorção de nutrientes pela formação de complexos mais solúveis com macro e micronutrientes. Além disso, promovem a energização de transportadores de íons pela indução da atividade das bombas de prótons e efeitos similares aos dos hormônios vegetais, tais como os da auxina, ligados à promoção da emergência de raízes laterais (NARDI et al., 2009)

Estudos demonstram que grande parte dos efeitos bioestimulantes do AH tem sido creditada à sua atividade similar às auxinas (CANELLAS et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002). Zandonadi (2006), ao estudar o efeito das SH em plantas mutantes insensíveis a auxina comprovou a ação hormonal do tipo auxínica, promovida por SH isoladas de diferentes fontes de matéria orgânica. Segundo Zandonadi et al. (2010), AH extraídos de vermicompostagem podem induzir a produção de óxido nítrico (ON) nos sítios de emissão de raízes laterais. O ON teria a capacidade de ativar as bombas de H⁺ das células vizinhas, desencadeando o mecanismo de crescimento ácido, responsável pela proliferação e alongação celular associado à formação das raízes laterais.

2.2 A importância das bactérias diazotróficas endofíticas para plantas não leguminosas

Diferentemente dos rizóbios, as bactérias diazotróficas endofíticas não possuem fatores de nodulação ativos para a nodulação, e a entrada bem-sucedida na planta hospedeira ocorre, principalmente, através das aberturas no ponto de emergência de raízes laterais, ferimentos na epiderme e aberturas estomáticas (JAMES & OLIVARES, 1998).

As bactérias utilizam parte dos fotoassimilados da planta hospedeira para gerar a energia necessária para promover o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Por outro lado, a planta se beneficia do N fixado pela bactéria para síntese de suas proteínas. A utilização dessas bactérias endofíticas, conhecidas também como bactérias promotoras do crescimento vegetal, contribui para a FBN e auxilia no suprimento da demanda de N das plantas (JAMES & OLIVARES, 1998).

Dentre as bactérias que possuem a capacidade de fixar N em plantas não leguminosas destacam-se a *Herbaspirillum seropedicae*, isoladas de *Poaceae*, tais como: milho, sorgo, cana-de-açúcar e várias espécies forrageiras crescidas no Brasil (BALDANI et al., 1986a). Baldani & Baldani (2005) demonstraram que a inoculação de arroz com *H. seropedicae* promoveu um aumento de rendimento equivalente ao tratamento com 40 kg N ha⁻¹.

Oliveira et al. (2002) utilizaram a combinação de espécies endofíticas PAL5 (*Gluconacetobacter diazotrophicus*), CBAmC (*Azospirillum amazonense*), HRC54 (*Herbaspirillum seropedicae*), HCC103 (*Herbaspirillum rubrisubalbicans*) e PPe8 (*Burkholderia tropica*) em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar. As plantas foram crescidas em vaso com solo durante doze meses e observaram que tais bactérias promoveram a FBN, que contribuíram com até 30% do N absorvido nas plantas, dependendo da combinação de bactérias utilizadas.

Os estudos da contribuição da FBN em função de genótipos de cana-de-açúcar e estirpes bactérias fixadores de N demonstraram contribuições nos valores de 30 a 70%. (URQUIAGA et al., 1992; OLIVEIRA et al., 2002). Os resultados de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, inoculadas com as estirpes *G. diazotrophicuse H. seropedicae*, apresentaram incrementos na biomassa radicular entre 50 e 350 % em relação ao controle não inoculado (OLIVARES et al., 2000).

Vários estudos confirmaram a contribuição da FBN na cultura da cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1992; LIMA et al., 1987; BODDEY et al., 1995). Além da contribuição da FBN, os microrganismos promotores do crescimento vegetal promovem a produção de fitormônios, síntese de sideróforos, solubilização de fosfato e, através do antagonismo, a fitopatógenos (NEILANDS & LEONG, 1986; RODRIGUES & FRAGA, 1999; BLANCO et al., 2005).

2.3. O uso de bioestimulantes à base de substâncias húmicas e bactérias promotoras do crescimento vegetal

A necessidade de implantação de novos sistemas de produção que proporcionem menor impacto ambiental impulsiona os estudos com bactérias diazotróficas endofíticas, devido ao seu elevado potencial de promover o crescimento vegetal.

A cultura da cana-de-açúcar responde pouco à adubação nitrogenada. Foram realizados vários experimentos visando tal análise. Segundo Espironello et al. (1980), em apenas 35% dos experimentos avaliados, a adubação nitrogenada promoveu aumento na produção de cana planta. Ao analisar 81 experimentos no estado de São Paulo, Cantarella & Raij (1985) constataram que somente 40% dos experimentos apresentaram resposta à adubação nitrogenada em cana planta. Mesmo com alguns estudos isolados terem demonstrado alguma resposta à adubação com N, Schultz et al. (2012) verificaram que não foi observado efeito de adubação nitrogenada na produtividade da cultura, principalmente em função do manejo e da variedade.

Além da FBN, a utilização de bioestimulantes à base de BPCV e SH pode promover o desenvolvimento vegetal. A utilização de SH em conjunto com bactérias diazotróficas pode promover o aumento da população de bactérias introduzidas nas plantas e, conseqüentemente, incrementar os efeitos benéficos sobre a planta hospedeira. Marques-Junior et al. (2008) estudaram a viabilidade de reintrodução de microrganismos endofíticos depois do tratamento térmico de microtoletes de cana-de-açúcar na presença de AH e verificaram aumento significativo na indução do crescimento radicular e na população de microrganismos diazotróficos.

O uso de BPCV na presença de SH tem demonstrado bons resultados na cultura do milho. Canellas et al. (2013) verificaram que a aplicação foliar no estágio V6 de na presença de SH isoladas a partir de vermicomposto de esterco bovino, resultou no aumento da produção de grãos de milho em 65% em solo com baixa disponibilidade de N.

A utilização de SH e BPCV na cultura do milho em lavoura comercial com aplicação via foliar do bioestimulante e diferentes doses de adubação nitrogenada foram estudadas por (CANELLAS et al., 2015). Os autores observaram que no ano agrícola de 2009/2010, todos os níveis de N-ureia utilizados (0, 45, 90 e 180 kg N ureia ha⁻¹), apresentaram uma produção de grãos significativamente maior com uso combinado de SH e BPCV, em relação ao controle em todas as doses de N testadas. Um fato importante a se destacar é que houve um elevado déficit hídrico durante quase todo período de crescimento da cultura marcado pela escassez de chuva. No ano agrícola 2010/2011 o regime de chuvas ocorreu de forma regular e o aumento da produção com o uso combinado de SH e BPCV foi observado somente nas doses mais baixas de N-ureia (0, 19 e 37,5 kg N-ureia ha⁻¹).

A aplicação do bioestimulante mostrou-se eficiente em caso de déficit hídrico. A coinoculação de BPCV e SH proporcionou aumento na recuperação do estresse hídrico em feijoeiro (MELO et al., 2017). Aguiar et al. (2016) estudaram as adaptações fisiológicas e metabólicas responsáveis pela melhor recuperação da cana-de-açúcar, após a seca em plantas inoculadas. Os AH auxiliaram na recuperação do estresse ao induzirem a atividade enzimática antioxidante, enquanto as BPCV induziram a preservação do potencial hídrico das folhas, fechando os estômatos de forma eficiente, o que resultou na preservação da água na planta.

Os resultados experimentais indicam um potencial elevado para o uso de BPCV em conjunto com SH (CANELLAS & OLIVARES, 2014). Além disso, o uso de SH e BPCV em culturas de interesse agrícola vem sendo testado e os resultados confirmam sua atividade na promoção do crescimento vegetal de diversas culturas como descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Efeitos das substâncias húmicas e bactérias promotoras do crescimento vegetal

Planta	Descrição simplificada ensaio	Efeitos	Referências
Abacaxi	AH de vermicomposto combinado com (BPCV), ensaio em casa de vegetação	Melhoria do crescimento e adaptação de mudas de abacaxizeiro ao ambiente <i>ex vitro</i>	Baldotto et al. (2010)
Cana-de-açúcar	AH de vermicomposto combinado BPCV; aplicação <i>in vitro</i> na cana-de-açúcar micropropagada, experimento de campo	Aumento de 53% na produtividade na cana planta	Marques Jr. (2010)
Milho	AH de vermicomposto aplicado com e sem a presença de BPCV; 3 épocas de aplicação foliar (4 folhas, 4+8 folhas, e 8 folhas)	Efeito do tratamento AH+ bactérias foi em média 90,06% superior à produtividade das plantas controle ao realizar duas aplicações (4+8 folhas),	Marques Jr. (2010)
Tomate	AH de vermicomposto combinado com BPCV; aplicação substrato e pulverização foliar; experimento de campo	Aumento da produção de frutos por 44-80%; diminuição da incidência de <i>Phytophthora infestans</i>	Olivares et al. (2015)

AH = ácidos húmicos; AF= ácidos fúlvicos; BPCV = bactérias promotoras do crescimento vegetal

2.4 Métodos de aplicação de bactérias promotores do crescimento vegetal em plantas

A chave para a viabilidade de processos microbianos na agricultura é a seleção de estirpes eficazes com metabolismo direcionado para promover o crescimento dos hospedeiros e metodologia de inoculação das culturas a campo (IKEDA et al., 2013). Além disso, os efeitos podem ser influenciados pela espécie e idade da planta, concentração e forma de aplicação do produto (foliar ou diretamente no solo), tipo de solo e condições ambientais, entre outros aspectos.

O veículo ou transportador das BPCV refere-se ao substrato abiótico (o qual pode ser sólido, líquido ou gel). A formulação é o processo de unificação do veículo com o microrganismo. O termo inoculante refere-se ao produto final da formulação, contendo o veículo e o agente bacteriano ou consórcio de microrganismos (BASHAN et al., 2014).

Os inoculantes devem atender os seguintes requisitos (i) permitir o crescimento dos microrganismos contidos nos mesmos; (ii) manter o número necessário de células microbianas viáveis em boa condição fisiológica por um período de tempo aceitável; (iii) o inoculante deve apresentar o número de células viáveis de bactérias, após o processo de formulação para proporcionar a respostas esperadas (DATE, 2001; STEPHENS & RASK, 2000).

Dentre os métodos de inoculação de microrganismos, a inoculação de sementes é a mais utilizada até hoje, principalmente devido à sua praticidade. Esse método é utilizado para inoculação de plantas leguminosas como a soja. As sementes podem ser inoculadas com inoculante turfoso ou líquido. No primeiro caso, as sementes são umedecidas com solução açucarada ou adesiva, para inoculantes líquidos aplica-se o mesmo diretamente nas sementes. Outro método é a aplicação do inoculante por aspersão no sulco, por ocasião da semeadura, em solos com ou sem população estabelecida (MERCANTE et al., 2011).

As plantas não leguminosas não nodulam, logo é necessário que haja um método diferente de inoculação de microrganismo. Schultz et al (2012) testaram a inoculação de 5 estirpes de bactérias diazotróficas, Pal5^T, de *Gluconacetobacter diazotrophicus*; Cbamc, de *Herbaspirillum seropedicae*; HRC54, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; HCC103, de *Azospirillum amazonense*; e PPe8^T, de *Bulkholderia tropicanas* variedades RB72454 e RB867515 em cana planta e segunda soqueira. Na cana planta foram utilizados toletes provenientes de plantas micropropagadas,

que receberam inoculação no viveiro e no plantio definitivo em campo. Nesse caso, os toletes foram colocados em sacos de rafia e imersos na suspensão inoculante com diluição de 12,5 g L⁻¹ de bactérias, sendo a turfa estéril utilizada como veículo. Após a imersão, os toletes foram retirados da solução, mantidos à sombra natural por 30 minutos e, em seguida, foram plantados. A inoculação foi comparada com a aplicação de 120 kg ha⁻¹ na forma de ureia, no momento do plantio em campo. Na segunda soqueira, foi realizada a aplicação do inoculante com bactérias diazotróficas (12,5 g de inoculante por litro de suspensão), com diluição igual à utilizada para o plantio. A aplicação na cana soca foi realizada três dias após a colheita, com utilização de aplicador pulverizador costal, com jato dirigido à base da soqueira, a 14 mL m⁻¹ linear de sulco, equivalente à dose de 100 L ha⁻¹.

Foi observado que a inoculação não influenciou a produtividade de colmos da variedade RB72454, nas duas colheitas avaliadas. Já a variedade RB867515 apresentou diferenças significativas quanto à produtividade de colmos na segunda soqueira. Além disso, a inoculação das bactérias diazotróficas promoveram um incremento na produtividade similar à adição de 120 kg ha⁻¹ de N fertilizante à variedade de cana-de-açúcar RB867515.

Algo a se destacar é que o genótipo da planta pode influenciar na resposta à inoculação, fato esse que pode explicar a variedade RB72454 não ter apresentado respostas à inoculação.

A imersão de colmos é uma prática inviável em lavouras comerciais. Uma alternativa é a inoculação com a pulverização foliar. Em experimentos de campo, Marques Jr. (2010), ao realizar a aplicação foliar de AH extraídos de vermicomposto e BPCV (*Herbaspirillum seropedicae* HRC 54) aos 100 dias após o plantio da cana-de-açúcar, observou incrementos de até 23% na produtividade. Contudo, é necessário que sejam realizados estudos de época de aplicação do inoculante que proporcione os melhores resultados. Segundo Dillewijn (1952), a necessidade de N pela cana-de-açúcar é crucial no período de formação da cultura, que vai do período imediatamente após a germinação até o fechamento do canavial, o que ocorre normalmente entre os 3 a 5 meses. Além da cana-de-açúcar, a inoculação de AH e BPCV tem apresentado ganhos significativos em outras culturas com a aplicação foliar.

3. CÁPITULO 1

APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA PRESENÇA DE ÁCIDOS HÚMICOS EM CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

O uso de bioestimulantes vem demonstrando grande potencial para estimulação da produção, porém a maioria dos trabalhos é restrita à avaliação de estirpes em laboratório ou, mais raramente, em casa de vegetação. Este trabalho foi baseado na hipótese de que o uso combinado de ácidos húmicos (AH) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) proporciona aumento na produção de cana-de-açúcar em condições de campo. O objetivo foi avaliar a melhor forma e época de utilizar o bioestimulante formulado à base de BPCV na presença de AH. Para tanto, foram realizados dois experimentos independentes a campo, utilizando-se lavoura comercial de cana-de-açúcar nos quais foram analisadas a produção e a qualidade da cana planta e de duas socas consecutivas. No primeiro experimento, foi utilizado o delineamento em parcelas subdivididas, no qual foi comparada a aplicação do bioestimulante no sulco de plantio com a aplicação foliar. Nas subparcelas foram avaliadas três épocas de aplicação: 60, 90 e 60+90 dias após a emergência e comparadas com o tratamento controle sem aplicação. Nas duas socas subsequentes, avaliou-se somente aplicação foliar do bioestimulante. Não houve diferença entre aplicação ou não do bioestimulante no sulco de plantio. A

aplicação foliar, aos 60 dias após a emergência, proporcionou um aumento de 36% em relação ao controle. Na primeira soca não foi observado efeito dos tratamentos inoculados em relação ao controle. Esse período foi marcado por uma seca intensa na região que ocasionou perdas de produtividade na cana-de-açúcar. Na segunda soca ocorreu o regime regular de chuvas e foi observado, novamente, o aumento de produtividade de 24% em relação ao controle com a aplicação do bioestimulante foliar, aos 60 dias após a emergência. No segundo experimento foi utilizado o delineamento experimental em faixas e foi avaliada novamente a aplicação foliar em cana soca, com aplicação tratorizada do bioestimulante, aos 60 dias após a emergência. A aplicação do bioestimulante proporcionou incrementos de 19 e 16% na produção de colmos em comparação com o tratamento controle nas duas socas, respectivamente. Em todos os experimentos não foram observadas alterações na qualidade industrial da cana avaliada pelo teor de sólidos solúveis. O uso do bioestimulante na cultura da cana-de-açúcar proporcionou ganho na produção de colmos, sem influenciar as características industriais da planta. Portanto, é uma ferramenta biotecnológica que pode ser utilizada, visando ganhos de produção em áreas com baixo nível de fertilização nitrogenada.

Palavras-chave: bioestimulante, BPCV, brix, substâncias húmicas

Abstract

The use of biostimulants has shown great potential for production stimulation, however, the most studies is restricted to evaluation of strains in laboratory or, more rarely, in greenhouse conditions. This work was based on the hypothesis that the combined use of humic acids (HA) and plant growth promoting bacteria (PGPB) provides an increase in sugarcane production under field conditions. The objective was to evaluate the best way and time to use the biostimulant formulated with PGPB in the presence of HA. For this, two independent experiments were carried out in the field using commercial sugarcane plantation, being studied the production and quality of the plant cane and two consecutive ratoons. In the first experiment, a split-plot design was used, being compared groove and foliar application of biostimulant. In the subplots, three application times were evaluated: 60, 90 and 60 + 90 days after emergence and compared with the control treatment without application. In the two consecutive ratoons, just foliar application was analysed. There was no difference between application or not of the biostimulant in planting groove. Foliar application 60 days after emergence provided an increase of 36% over control. In the first ratoon, no significant effect was noted in inoculated treatments compared to control. This period was marked by an intense drought in the region which caused productivity losses in sugarcane. In the second ratoon, regular rainfall regime occurred and an increase of 24% in productivity was again observed compared to control, with the biostimulant application 60 days after cutting. In the second experiment, the experimental design was used in zone and the foliar application of the biostimulant was again evaluated 60 days after cutting. Biostimulant application provided increases of 19 and 16% in stalk production compared to control treatment in the two ratoons, respectively. No changes were observed in industrial quality of sugarcane, which was evaluated by soluble solids content. The use of biostimulant in sugar cane crop improved the production of stalks without influencing industrial characteristics of the plant. Therefore, it is a biotechnological tool that may be used for production gains in areas with low levels of nitrogen fertilization.

Keywords: biostimulants PGPB, brix, humic substances

1. Introdução

A estimativa da produção de cana-de-açúcar no Brasil para a safra 2016/17 é de 684,77 milhões de toneladas, sendo a área a ser colhida avaliada em 8.973,2 mil hectares. A produção de açúcar deverá atingir 39,96 milhões de toneladas, enquanto a produção de etanol deve se manter acima de 27,5 bilhões de litros. Isso evidencia a importância da cultura da cana-de-açúcar (CONAB 2016). Incrementos na produção, mesmo que pequenos, podem se transformar em grandes ganhos devido à grande área cultivada no país.

As bactérias promotoras do crescimento vegetal podem atuar de forma direta ou indireta no desenvolvimento das plantas, por meio da produção de fitormônios, solubilização de nutrientes como os fosfatos, fixação do nitrogênio, aumento da absorção pelas raízes, tolerância a estresses abióticos e controle biológico de fitopatógenos (AHMAD & KIBRET, 2014; GLICK, 2012, AHMAD et al., 2008).

No Brasil, a Embrapa Agrobiologia lançou um inoculante para a cana-de-açúcar, visando tornar a cultura mais eficiente e ambientalmente correta por meio da redução do uso do N-fertilizante na cultura. O inoculante microbiano consiste em um coquetel de bactérias diazotróficas endofíticas misturadas à turma moída, que é aplicado via imersão de colmos em cana planta (REIS et al., 2009a) e, em soqueiras, aplicado no sulco após o corte da cana (REIS et al., 2009b). A otimização das respostas e a ampliação do uso da tecnologia de inoculação dependem do conhecimento dos fatores envolvidos na produção do inoculante e da sua interação com a planta.

Um novo conceito de bioestimulante vem sendo desenvolvido baseado no uso combinado de substâncias húmicas (SH), derivadas de vermicompostagem de fonte renovável e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), visando estimular o metabolismo vegetal e à economia no uso de nutrientes na agricultura.

Os ácidos húmicos (AH) podem alterar tanto a estrutura de comunidades microbianas, como promover a indução de raízes laterais (PUGLISI et al., 2009). Esse aumento na proliferação de raízes laterais favorece a colonização de BPCV (CANELLAS et al., 2013). Além disso foram observadas alterações no metabolismo de carboidratos e nitrogênio, resultando em maior eficiência fotossintética em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio.

Um problema considerável é encontrar a melhor forma de aplicar o inoculante em plantas não leguminosas, pois deve ser uma prática fácil e simples em nível comercial. Em lavouras comerciais de cana-de-açúcar, a aplicação via imersão de colmos torna-se inviável. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o uso do bioestimulante à base de BPCV, na presença de AH em cana-de-açúcar, via aplicação no sulco de plantio e pulverizações foliares em diferentes épocas em cana planta e duas socas consecutivas.

2. Material e métodos

2.1 Localização, tipo de solo e manejo da adubação

Foram realizados dois experimentos independentes a campo em lavoura comercial de cana-de-açúcar, localizada na Fazenda Abadia em 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. O clima local é Aw na classificação de Köppen, tropical quente e úmido, com temperatura média anual de 23,1°C (com média máxima diária de 29°C; e mínima máxima de 19°C). A precipitação anual média é de 885 mm, com 71% das chuvas concentradas de outubro a março. A precipitação média mensal ocorrida durante a execução do experimento é mostrada na Figura 1.

O solo foi classificado como Cambissolo Flúvico Eutrófico de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação do Solo e apresentou as seguintes características na camada arável (0-0,2 m): pH = 5,4; P = 6 (mg/dm³); K⁺ = 0,21 (cmol_cdm⁻³); Ca⁺⁺ = 4,3 (cmol_cdm⁻³); Mg⁺⁺ = 2,3 (cmol_cdm⁻³); Al⁺⁺⁺ = 0,4 (cmol_cdm⁻³); H⁺ + Al = 6,2; Na⁺ = 0,1 (cmol_cdm⁻³); C = 14,2 (g dm⁻³); MO = 24,5 (g/dm³); CTC: 131 (mmol_c dm⁻³); V: 53%. A análise foi realizada em amostra composta (10 sub amostras) e em laboratório de rotina (UFRRJ, Campus Campos dos Goytacazes - RJ), de acordo com a metodologia preconizada pela Embrapa (1999). A adubação de plantio foi realizada com 400 kg ha⁻¹ de fertilizante 04-30-16, correspondendo a 16 kg de N, 120 kg P e 60 kg de K, respectivamente. Foram realizadas duas irrigações com lâmina de água de aproximadamente 40 mm intervaladas em 15 dias, para garantir a brotação. A variedade utilizada foi a RB 86 7515.

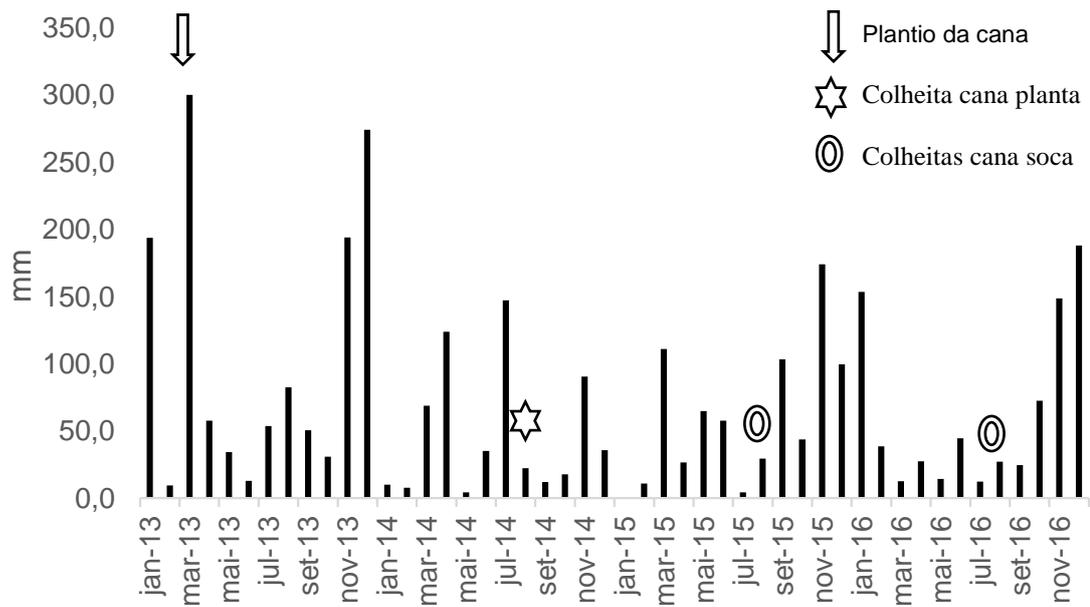


Figura 1. Precipitação média mensal (mm) em Campos dos Goytacazes durante o período de realização do experimento. Plantio em março de 2013; Colheita da cana planta, em agosto de 2014 e da primeira e segunda socas, em agosto de 2015 e 2016, respectivamente. Fonte: UFRRJ.

2.2 Obtenção do inóculo, dos ácidos húmicos e preparo do bioestimulante

Foi obtido um inóculo misto a partir do cultivo isolado das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC 54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; (estirpe HCC103) e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL 5). As estirpes foram crescidas separadamente em 5 mL de meio DYGS a 30°C por 36 h. Uma alíquota de 20 µL de cada estirpe utilizada foi inoculada num frasco de 2000 mL, com meio DYGS nas mesmas condições de crescimento por 48 h em agitação contínua (*shaker*) a 140 rpm. Em seguida, a biomassa bacteriana foi centrifugada a 2000 g por 10 min, ressuspensa em água esterilizada e a absorbância foi ajustada até 10^9 células mL⁻¹, usando o comprimento de onda em 496 nm.

Os ácidos húmicos foram extraídos de vermicomposto produzido com torta de filtro da usina de cana-de-açúcar e minhocas californianas vermelhas. Os detalhes da produção do vermicomposto foram descritos por Aguiar et al. (2013). Dez litros de vermicomposto foram misturados a 100 L de KOH 0,1 mol L⁻¹, agitados manualmente de forma vigorosa e depois mantidos em repouso durante uma noite. Após o período de decantação, o sobrenadante foi sifonado e, imediatamente, acidificado a pH 2,0 com HCl 6 mol L⁻¹. O extrato acidificado foi mantido em repouso por uma noite e novamente sifonado. Os ácidos húmicos precipitados foram centrifugados a 2765 g por 15 min. Os ácidos fúlvicos foram descartados e os ácidos húmicos foram novamente centrifugados a 2765 g com 500 mL de água destilada. Após a lavagem, os ácidos húmicos foram reunidos e titulados até pH 7.0 com KOH 0,1 mol L⁻¹, congelados e secos por liofilização. O conteúdo de carbono foi analisado por combustão seca num analisador automático Perkin Elmer 1400 (Madison, Estados Unidos).

O bioestimulante foi produzido a partir da adição das bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe HRC 54), *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; HCC103 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL 5) em suspensão, contendo 10^8 células viáveis por mL, combinadas com ácidos húmicos (20 mg C L⁻¹), preparados imediatamente antes do uso.

2.3 Experimento em fatorial utilizando blocos casualizados em parcelas subdivididas

Foi utilizado um delineamento em fatorial com os tratamentos distribuídos em blocos casualizados e em parcelas subdivididas com cinco repetições, no qual foi comparada a aplicação do bioestimulante no sulco de plantio com a aplicação foliar (parcela) em três épocas de aplicação foliar (subparcela): 60, 90 e 60+90 dias após a emergência.

As parcelas consistiram de cinco linhas com 20 m de comprimento, com espaçamento de 1,5 m. As subparcelas consistiram de cinco linhas de 5 m de comprimento com 1,5 m de espaçamento, sendo consideradas como área útil na colheita as três linhas centrais. Na Figura 2 mostra o momento da aplicação dos tratamentos.



Figura 2- Aplicação do bioestimulante no sulco de plantio (A) e aplicação foliar aos 60 dias após a emergência (B).

As parcelas receberam a inoculação no sulco de plantio utilizando um regador manual na taxa de 1 L de biofertilizante por metro linear. Nas sub parcelas as pulverizações foliares foram realizadas com uso de um pulverizador costal e foram feitas na dose equivalente a 400 L ha⁻¹ do biofertilizante. Um anteparo de plástico com comprimento igual da sub parcela foi utilizado para evitar a deriva (Figura 1 B). O experimento foi colhido com 18 meses (agosto de 2014). Nas duas socas subsequentes obtidas com 12 meses de crescimento da cana de açúcar no campo foi utilizado o delineamento fatorial em blocos casualizados com cinco repetições no qual foi avaliado somente a aplicação foliar do biofertilizante: 60, 90 e 60+90 dias após o corte e comparadas com o tratamento controle sem aplicação. As parcelas consistiram de cinco linhas de 5 m de comprimento com 1,5 m de espaçamento, sendo consideradas como área útil na colheita as três linhas centrais

2.4 Experimento em faixas

Foi utilizado o delineamento experimental em faixas com 25 m de largura com cinco repetições e espaçamento entre linhas de 1,5m. Foi avaliada a aplicação foliar do bioestimulante com aplicação tratorizada, aos 60 dias após a emergência em duas socas. A taxa de aplicação foi o equivalente a 400 L ha⁻¹.

2.5 Análises dos experimentos

Ambos os experimentos receberam os mesmos tratamentos culturais, foram analisadas a produção de colmos frescos por corte manual e pesagem da produção em balança eletrônica (100 quilos). O teor de sólidos solúveis totais (Brix) foi determinado utilizando refratômetro portátil e analógico RH B32. O equipamento foi calibrado com água destilada, sendo a leitura ajustada, quando necessário, ao valor zero na escala Brix. Após calibrar o aparelho, duas gotas da amostra foram colocadas sobre o prisma limpo e seco. O prisma foi fechado e, após alguns segundos, quando a temperatura do caldo atingiu a temperatura do prisma de 20°C, a leitura do Brix refratométrico foi efetuada.

Para análise de N total nas folhas, coletaram-se amostras de 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 65°C, com circulação forçada de ar por 72 horas e moídas em moinho de bola. O N total foi determinado por combustão seca, utilizando analisador elementar Perkin Elmer 2400 (Madison, Estados Unidos).

2.6 Análise estatística

Os parâmetros avaliados foram submetidos à análise de variância de acordo com esquema proposto por Pimentel-Gomes (1990), para experimentos em blocos inteiramente casualizados em parcelas subdivididas e em faixas de acordo com a tabela 1. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos com diferença significativa pelo teste F foram comparadas pelo teste de Fisher (LSD), com significância de 5% a partir do uso do *software* *Sisvar*® versão 5.1.

Tabela1. Esquema da análise de variância para análise de dados dos experimentos realizados a campo.

Experimento fatorial em blocos inteiramente casualizados em parcelas subdivididas (cana planta) –	
Causas da Variação	GL
Aplicação no Sulco (A)	1
Aplicação Foliar (B)	3
Resíduo (a)	8
Parcela	9
Aplicação no sulco x Aplicação foliar	3
Resíduo (b)	24
Experimento em fatorial com blocos inteiramente casualizados – (duas socas consecutivas)	
Causas da variação	GL
Bloco	9
Aplicação Foliar	3
Resíduo	27
Experimento em Faixa - (duas socas consecutivas)	
Causas da Variação	GL
Repetição (faixa)	4
Tratamento (aplicação)	1
Resíduo	4

3. Resultados

Os resultados de análise da variância do experimento com cana planta são mostrados na Tabela 2. Em relação à produção de colmos frescos, verificaram-se efeitos significativos para aplicação no sulco de plantio e foliar, que atuaram de forma dependente, ou seja, a interação foi significativa. Para os demais parâmetros analisados como Brix e teor de N nas folhas, não foi observada significância pelo teste F.

Tabela 2. Análise da variância em experimento fatorial, utilizando blocos inteiramente casualizados em parcelas subdivididas (cana planta) realizada a campo.

Produção de colmos			
Causas da Variação	GL	QM	F
Aplicação no Sulco (A)	1	207,98	23,56**
Aplicação Foliar (B)	3	1050,46	31,01**
Resíduo (a)	8	8,82	
Parcela	9	278,57	
Aplicação no sulco x Aplicação foliar	3	294,61	8,69**
Resíduo (b)	24	33,86	
Teor de sólidos solúveis – Brix			
Causas da Variação	GL	QM	F
Aplicação no Sulco (A)	1	5,41	4,10 ^{ns}
Aplicação Foliar (B)	3	1,96	2,50 ^{ns}
Resíduo (a)	4	1,32	
Parcela	9	12,38	
Aplicação no sulco x Aplicação foliar	3	2,33	2,96 ^{ns}
Resíduo (b)	24	0,79	
Teor de nitrogênio na folha			
Causas da Variação	GL	QM	F
Aplicação no Sulco (A)	1	10,00	1,33 ^{ns}
Aplicação Foliar (B)	3	114,40	0,79 ^{ns}
Resíduo (a)	4	7,50	
Parcela	9	508,40	
Aplicação no sulco x Aplicação foliar	3	191,60	1,33 ^{ns}
Resíduo (b)	24	143,83	

^{ns}Não Significativo, *Significativo a 5%, **Significativo a 1%, de probabilidade pelo teste F.

A colheita da cana planta ocorreu 18 meses após o plantio. O resultado do método de aplicação do bioestimulante é mostrado na Tabela 3. Observou-se que a aplicação foliar foi mais eficiente do que a aplicação no sulco de plantio, o incremento em relação ao controle foi de 29%, o que representou um aumento de 21 toneladas ha⁻¹.

Os resultados referentes a épocas de aplicação na cana planta e nas duas socas subsequentes são apresentados na Tabela 5. Na cana planta foi observado que uma única aplicação, aos 60 dias após a emergência (DAE), promoveu incremento de 37% em relação ao controle. Na primeira soca não foram observadas diferenças entre os tratamentos, o que pode ter influenciado nesse resultado foi o baixo volume de chuva durante o período de crescimento da cana-de-açúcar (Figura 1). Na segunda soca, o tratamento que recebeu aplicação aos 60 dias após a emergência (DAE) promoveu incremento de 24% em relação ao controle, o que representou um ganho de 16 toneladas ha⁻¹. O uso do bioestimulante não promoveu alterações no teor de sólidos solúveis e no teor de nitrogênio nas folhas (Tabelas 2 e 4).

Tabela 3. Efeito do método de aplicação de bioestimulantes na produção de cana-de-açúcar, teor de sólidos solúveis (Brix) e teor de N nas folhas no crescimento de plantas. A colheita foi feita após 18 meses após o plantio.

	Cana planta		
	Controle	Sulco	Aplicação foliar
	Produção Colmos (Mg ha ⁻¹)		
	72,0b	68,4b	92,7a
Incremento em relação ao controle (%)	-	-	28,8
C.V. (%)	4,5		
	Brix (%)		
	Controle	Sulco	Aplicação foliar
	22,2	22,0	22,5
C.V. (%)	3,6		
	Teor total de N nas folhas (kg ha ⁻¹)		
	Controle	Sulco	Aplicação foliar
	208	202	211
C.V. (%)	6,3		

Médias seguidas de letra diferente, diferem pelo teste LSD Fisher ($p < 0,05$). Incrementos em relação ao controle foi calculado por: $100 \cdot (x-y)/y$, sendo x a média do tratamento e y a média do controle. CV (%) é o coeficiente de variação. O bioestimulante foi preparado com uma suspensão bacteriana de 10^8 células viáveis por mL⁻¹ combinadas com ácidos húmicos (20 mg C L^{-1})¹ e aplicado na dose equivalente a 1 L por metro linear no sulco de plantio e a 450 L ha⁻¹ nas aplicações foliares.

Os resultados da análise de variância da primeira e segunda soca são mostrados na Tabela 4. Não foram observados efeitos significativos para nenhum parâmetro analisado na primeira soca. No entanto, na segunda soca houve aumento significativo na produção de colmos frescos.

Tabela 4. Análise de variância do experimento cana-de-açúcar 1ª e 2ª soca realizada a campo.

Experimento em fatorial com blocos inteiramente casualizados (1ª soca) –			
Produção de colmos			
Causas da variação	GL	QM	F
Bloco	9	22,64	1,36 ^{ns}
Aplicação Foliar	3	16,72	1,00 ^{ns}
Resíduo	27	16,67	
Teor de sólidos solúveis – Brix			
Causas da variação	GL	QM	F
Bloco	9	0,64	1,62 ^{ns}
Aplicação Foliar	3	0,20	0,52 ^{ns}
Resíduo	27	0,40	
Teor de nitrogênio na folha			
Causas da variação	GL	QM	F
Bloco	9	208,00	0,86 ^{ns}
Aplicação Foliar	3	145,47	0,60 ^{ns}
Resíduo	27	240,95	
(2ª soca) –			
Produção de colmos			
Causas da variação	GL	QM	F
Bloco	9	11,24	0,90 ^{ns}
Aplicação Foliar	3	556,44	45,01 ^{**}
Resíduo	27	12,36	
Teor de sólidos solúveis – Brix			
Causas da variação	GL	QM	F
Bloco	9	0,96	1,03 ^{ns}
Aplicação Foliar	3	0,40	0,42 ^{ns}
Resíduo	27	0,93	

Teor de nitrogênio na folha			
Causas da variação	GL	QM	F
Bloco	9	218,90	0,61 ^{ns}
Aplicação Foliar	3	101,97	0,28 ^{ns}
Resíduo	27	356,11	

^{ns}Não Significativo, *Significativo a 5%, **Significativo a 1%, de probabilidade pelo teste F

Tabela 5. Efeito do bioestimulante aplicado uma vez aos 60 e 90 dias após a emergência (DAE) e duas vezes (60 mais 90 DAE) na cana planta e em duas socas consecutivas, variedade RB 86 7515.

	Produção de colmos (Mg ha ⁻¹)			
	Controle	60 DAE	90 DAE	60+90 DAE
	Cana planta			
	72,0c	98,5a	86,7b	93,0a
Incremento em relação ao controle(%)	-	37	20	29
C.V. (%)	6,6			
	1 ^a soca			
C.V. (%)	63,9	66,9	66,2	65,0
	6,15			
	2 ^a soca			
	67,1c	83,4a	78,1b	82,3 ^a
Incremento em relação ao controle(%)	-	24	16	23
C.V. (%)	6,2			

Médias seguidas de letra diferente diferem pelo teste LSD Fisher ($p < 0,05$). Incrementos em relação ao controle foram calculados por: $100 \cdot (x-y)/y$, sendo x a média do tratamento e y a média do controle. CV (%) é o coeficiente de variação. O bioestimulante foi preparado com uma suspensão bacteriana de 10^8 células viáveis por mL⁻¹ combinadas com ácidos húmicos (20 mg C L⁻¹)¹ e aplicado na dose equivalente a 450 L ha⁻¹.

Os resultados da análise de variância do experimento em faixas, realizado a campo da primeira e segunda soca são mostrados na Tabela 6. Foram observados efeitos somente no parâmetro produção de colmos frescos nas duas socas consecutivas, pelo teste F. A aplicação do bioestimulante aos 60 dias após a emergência (DAE) promoveu incrementos de 19 e 18% em relação ao controle, o que equivale a um aumento de 11 e 13 toneladas ha⁻¹, nas duas socas respectivamente, tais resultados são mostrados na tabela 7. Não foram observadas alterações na qualidade industrial da cana-de-açúcar.

Tabela 6. Análise da variância em experimento em faixas (1ª e 2ª socas) realizado a campo.

Produção de colmos			
Causas da Variação	GL	QM	F
Repetição (faixa)	4	20,04	0,85 ^{ns}
Tratamento (aplicação)	1	275,62	11,66*
Resíduo	4	23,63	
Teor de sólidos solúveis – Brix			
Causas da Variação	GL	QM	F
Repetição (faixa)	4	0,27	8,81*
Tratamento (aplicação)	1	0,14	4,57 ^{ns}
Erro (a)	4	0,03	
Teor de nitrogênio na folha			
Causas da Variação	GL	QM	F
Repetição (faixa)	4	157,10	1,32 ^{ns}
Tratamento (aplicação)	1	28,90	0,24 ^{ns}
Resíduo	4	118,90	
(2ª soca)			
Produção de colmos			
Causas da Variação	GL	QM	F
Repetição (faixa)	4	30,37	2,43 ^{ns}
Tratamento (aplicação)	1	384,21	30,73**
Resíduo	4	12,50	
Teor de sólidos solúveis – Brix			
Causas da Variação	GL	QM	F
Repetição (faixa)	4	0,22	0,15 ^{ns}
Tratamento (aplicação)	1	0,53	0,36 ^{ns}
Resíduo	4	1,47	
Teor de nitrogênio na folha			
Causas da Variação	GL	QM	F
Repetição (faixa)	4	339,40	1,20 ^{ns}
Tratamento (aplicação)	1	144,40	0,51 ^{ns}
Resíduo	4	281,40	

^{ns}Não Significativo, *Significativo a 5%, **Significativo a 1%, de probabilidade pelo teste F

Tabela 7. Efeito da aplicação foliar tratorizada de bioestimulante aos 60 dias após a emergência (DAE), na produção de cana-de-açúcar em duas socas consecutivas.

	Produção de colmos (Mg ha ⁻¹)	
	Controle	Aplicação foliar
1ª soca		
	55,2b	65,7a
Incremento em relação ao controle (%)	-	19
C.V. (%)	8.0	-
2ª soca		
	Produção de colmos (Mg ha ⁻¹)	
	Controle	Aplicação foliar
	72,2b	85,2a
Incremento em relação ao controle (%)	-	18
C.V. (%)	4,5	

Médias seguidas de letra diferente diferem pelo teste LSD Fisher ($p < 0,05$). Incrementos em relação ao controle foram calculados por: $100 \cdot (x-y)/y$, sendo x a média do tratamento e y a média do controle. CV (%) é o coeficiente de variação. O bioestimulante foi preparado com uma suspensão bacteriana de 10^8 células viáveis por mL⁻¹ combinadas com ácidos húmicos (20 mg C L⁻¹)¹ e aplicado na dose equivalente a 450 L ha⁻¹.

4. Discussão

No presente trabalho foi avaliada a aplicação no sulco de plantio e via pulverização foliar do bioestimulante à base de BPCV na presença de AH na cultura da cana-de-açúcar. Verificou-se que a melhor forma de aplicar o bioestimulante foi via pulverização foliar, e que a melhor época de aplicação foi aos 60 dias após a emergência. A pulverização foliar é uma alternativa viável para aplicação no campo. Marques Jr (2010) obteve ganho de 23% ao realizar aplicação foliar de BPCV na presença AH, aos 100 dias após plantio em cana-de-açúcar. Além disso, também, não foi observado aumento nos teores de N nas plantas inoculadas da mesma forma que o encontrado no presente trabalho (Tabelas 2, 4 e 6).

A aplicação de BPCV na cultura da cana-de-açúcar, via imersão no inoculante por um período de 30 minutos, promoveu um incremento médio de 13% na produção de colmos. Além disso, os autores observaram similaridade entre os valores de delta¹⁵N nas folhas de cana-de-açúcar inoculadas e não inoculadas,

evidenciando que o inoculante não afetou a FBN. O incremento observado na produção de colmos, de aproximadamente 24 toneladas ha⁻¹, pode ter ocorrido devido ao efeito de promoção do crescimento vegetal (SCHULTZ et al., 2014).

As bactérias diazotróficas podem promover o crescimento das plantas pela produção de fitohormônios 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; VIDEIRA et al., 2012).

Oliveira et al (2006) estudaram a inoculação *in vitro* de diferentes estirpes de bactérias diazotróficas em duas variedades de cana-de-açúcar SP70-1143 e SP81-3250. Após a inoculação, as plântulas foram incubadas por um período de 5 dias *in vitro*. Em seguida foram aclimatizadas em viveiro por 60 dias. As plântulas foram cultivadas em condições de campo em três locais com tipos de solo contrastantes sendo estes apresentando: baixa, média e alta fertilidade natural, respectivamente. Foi observado que o uso de BPCV demonstrou-se eficiente na produtividade em solos com baixa e média fertilidade natural.

O efeito de AH na cultura da cana-de-açúcar em condições de campo foi relatado por Govindasmy & Chandrasekaran (1992), que avaliaram a imersão de colmos numa suspensão de AH a 0,3% durante 30 minutos, em comparação com a aplicação de AH no solo com doses de 3 e 6 g m², aplicadas no momento do plantio e aos 35 dias após o plantio. A imersão dos colmos e a aplicação no solo de 6 g m² de AH proporcionaram incrementos de 3 e 9% em relação ao controle, respectivamente. A época de aplicação não influenciou a produtividade da cana-de-açúcar.

A operação em grandes escalas dessas formas de introdução de microrganismos promotores do crescimento, seja imersão de colmos ou inoculação *in vitro*, é pouco prática. A metodologia de aplicação via foliar é simples e mostrou-se eficiente com resultados semelhantes ou melhores aos demais métodos de introdução de microrganismos. Foi observado que a inoculação foliar proporcionou ganho de produtividade de 26 toneladas ha⁻¹, na cana planta e de 16 toneladas na cana soca.

Ao analisar a perspectiva histórica da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, percebe-se que o seu desempenho nos últimos 40 anos foi muito aquém das demais culturas. Enquanto culturas como milho tiveram aumento médio na produtividade nacional de 210%, o trigo de 180% e a soja 90%, a cana-de-açúcar

obteve aumento de apenas 30% (CONAB; IBGE 2017). Tais melhorias são devido a implantações de tecnologias de alto custo como o sistema de irrigação e colheitas mecanizadas. Neste trabalho, foi observado um aumento médio de 24% em relação ao controle considerando ambos os experimentos, o que representa quase o aumento na produtividade média nacional dos últimos 40 anos. Tais resultados evidenciam que o bioestimulante baseado em BPCV, em conjunto com as SH, é uma tecnologia promissora sob a perspectiva econômica e ambiental.

Além disso, nos últimos anos, o setor sucroalcooleiro vem sofrendo a maior crise de sua história, com dezenas de usinas fechando suas portas e outras tantas entrando com pedidos de recuperação judicial, o que acarretou desemprego de milhares de trabalhadores. Além das demissões, os cortes nos gastos de produção forçam o abandono dos canaviais incluindo as práticas de adubação (TOLEDO, 2015). Neste contexto, o uso do bioestimulante é uma tecnologia de baixo custo que pode ser utilizada visando à manutenção ou aumento da produtividade uma vez que essa abordagem é mais eficaz em solos que apresentam baixa fertilidade.

No segundo ano do experimento ocorreu uma seca na região sudeste do Brasil, fato esse que acarretou em queda geral na produção e na produtividade. No entanto, o experimento conduzido em faixas na primeira soca apresentou incremento na produção de colmos, mesmo com a seca severa (Tabela 7). Em experimento prévio, conduzido em casa de vegetação, foi verificado que o uso de AH e BPCV proporcionou melhoria na recuperação do estresse hídrico em cana-de-açúcar (AGUIAR et al., 2016). Os mecanismos protetores contra estresse hídrico podem ter sido os responsáveis pelo aumento significativo do rendimento de colmos. Os ácidos húmicos ativaram enzimas antioxidantes, enquanto que BPCV promoveram alterações metabólicas impulsionando mecanismos protetores e a eficiência do fechamento de estômatos (AGUIAR et al., 2016).

5. Conclusões

O uso de bioestimulante à base de AH e BPCV foi eficaz no aumento da produção da cana-de-açúcar. Essa tecnologia é uma ferramenta que pode ser utilizada visando ganhos econômicos e ambientais principalmente em locais onde é baixo o uso de fertilizantes nitrogenados.

6. Referências

Aguiar NO, Medici LO, Olivares FL, Dobbss LB, Torres-Netto A, Silva SF, Novotny EH, Canellas LP (2016). Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. *Annals of Applied Biology* 168:203-213.

Ahemad, M., and Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26:1-20.

Ahmad, F.; Ahmad, I.; Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*. 163:173 – 181.

Canellas, L.P, Balmori, D.M, Médici, L.O, Aguiar, N.O, Campostrini, E., Rosa, R.C.C, Façanha, A.R, Olivares, F.L.A. (2013). Combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays L.*). *PlantandSoil*, 366:119-132.

Conab – Companhia Nacional de abastecimento (2017). Séries Históricas de Área Plantada. Produtividade http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&ordem=produto&Pagina_objcmsconteudos=3#A_objcmsconteudos. Acessado em 03 de março de 2017.

Conab. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. (2016) Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, safra 2016/17. Agosto. v.3.

Embrapa. (1999) Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Rio de Janeiro, RJ.

Glick, B. R. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Application: Disponível em: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>. Acessado em 03 de março de 2017.

Govindasmy R, Chandrasekaran S (1992). Effect of humic acids on the growth, yield and nutrient content of sugarcane. *Sci Total Environ* 117/118: 575-581.

Ibge (2017). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - *Anuário Estatístico do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 1977/2016. ISSN: 01001299. <http://biblioteca.ibge.gov.br/bibliotecacatalogo?view=detalhes&id=720->*

Marques, JR. (2010). *Uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na produção de milho e cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Programa de Pós – Graduação - Campos Dos Goytacazes, RJ - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 93p.

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 growthpromoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane in vitro. *Plant and Soil* 237: 47-54.

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

Oliveira ALM, Canuto ED, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JI (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *PlantSoil* 284: 23-32.

Pimentel-Gomes, F.(1990). *Curso de estatística experimental*. Piracicaba. Nobel. p.468.

Puglisi, E., Fragoulis, G., Ricciuti, P., Cappa, F., Spaccini, R., Piccolo, A., Trevisan, M., Crecchio, C. (2009). Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays L.*). *Chemosphere*, 77:829–837.

Reis, V. M., Pereira, W. & Hipólito, G. S. (2009). Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-soca para fins de determinação de eficiência agrônômica. *Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico*, 117, ISSN 1517-8862. Seropédica, 4p.

Reis, V. M., Pereira, W. & Hipólito, G. S (2009). Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-planta para fins de determinação de eficiência agrônômica. *Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico*, 118, ISSN 1517-8862. Seropédica.

Schultz, Nivaldo, Silva, Jeferson Alves da, Sousa, Jailson Silva, Monteiro, Rafael Cassador, Oliveira, Renan Pedula, Chaves, Valfredo Almeida, Pereira, Willian, Silva, Marinete Flores da, Baldani, José Ivo, Boddey, Robert Michael, Reis, Veronica Massena, & Urquiaga, Segundo. (2014). Inoculation of sugar cane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 38(2):407-414.

Toledo, M. (2015). Crise no setor canavieiro provoca fechamento de usinas e demissões. *Jornal Folha de São Paulo*. <http://www1.folha.uol.com.br/mercado/2015/07/1655141-crise-no-setor-canavieiro-provoca-fechamento-de-usinas-e-demissoes.shtml>. 15 de julho 2014. Acessado em 03 de março de 2017.

Videira, S.S.; Oliveira, D.M.; Morais, R.F.; Borges, W.L.; Baldani, V.L.D. & Baldani, J.I. (2012) Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum genotypes grown in the field. *Plant Soil*, 356:51-66.

CAPÍTULO 2

EFICIÊNCIA DA RECUPERAÇÃO DE NITRATO ($K^{15}NO_3$) EM FUNÇÃO DA APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS NA PRESENÇA DE ÁCIDOS HÚMICOS EM CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

O entendimento dos mecanismos responsáveis pelo aumento de produção da cana-de-açúcar induzida pelo bioestimulante à base de ácidos húmicos (AH) e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) é fundamental para ampliação do uso desta tecnologia. A análise do isótopo de nitrogênio de massa quinze (^{15}N) é uma ferramenta capaz de avaliar a eficiência de recuperação da adubação nitrogenada e, portanto, discriminar alguns efeitos dos AH e BPCV sobre as plantas. O objetivo do trabalho foi quantificar a recuperação de nitrogênio (N) em cana-de-açúcar em função da aplicação isolada ou em conjunto de AH e BPCV. Foi realizado um experimento em casa de vegetação, com a variedade de RB988503. O experimento foi conduzido em delineamento em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições. O solo foi enriquecido com N marcado na forma de nitrato de potássio ($K^{15}NO_3$) com 10% de átomos de ^{15}N , para avaliar a eficiência de recuperação de N. Os tratamentos foram: (i) AH, (ii) BPCV, (iii) AH + BPCV (iv) controle. Os resultados foram submetidos à análise de variância e os

efeitos dos tratamentos foram desdobrados em contrastes médios. Foram observados incrementos significativos na massa fresca e seca de raiz e parte aérea, além de aumento no conteúdo de N na parte aérea com a aplicação de AH e BPCV, aplicados isoladamente ou em conjunto. A aplicação isolada de AH promoveu a recuperação de N na raiz, sendo esse incremento de 17%.

Palavras-chave: isótopos, nitrogênio, BPCV.

Abstract

The understanding of mechanisms responsible for improvements in sugarcane production induced by biostimulants based on humic acids (HA) and plant growth promoting bacteria (PGPB) is critical to increase the use of this technology. The ^{15}N isotopic analysis is a tool capable of evaluating the efficiency of recovery nitrogen fertilization and, thus, discriminate some effects of HA and PGPB on plants. The objective of this study was quantify the efficiency of nitrogen (N) recovery in sugarcane, in function of the sole or combined application of AH and BPCV. A greenhouse experiment was carried out using the sugarcane variety RB 988503. The experiment was conducted in a complete randomized block design with four replicates. The soil was enriched with labeled N as potassium nitrate (K^{15}NO_3) with 10% of ^{15}N atoms, to evaluate efficiency of N recovery. The following treatments were used: (i) HA, (ii) PGPB, (iii) HA + PGPB (iv) control. The results were submitted to variance analysis, and the effects of the treatments were deployed in average contrasts. Significant increases were observed in fresh and dry root and shoot mass, and further increase in the N content in shoot, with the application sole or combined of HA and PGPB. The sole application of HA promoted the recovery in order to 17% of N content in the root.

Keywords: isotopes, nitrogen, PGPB

1.Introdução

A utilização de fertilizantes nitrogenados na agricultura está diretamente associada ao uso de fontes de energia não renovável e custos de produção cada vez maiores. O nitrogênio (N) é essencial no sistema de produção, sendo o responsável pelo aumento de produtividade, especialmente em solos de baixa fertilidade natural.

O N é nutriente mais limitante para o crescimento, perfilhamento e desenvolvimento da cana, além de representar um custo significativo na produção de canaviais (TRIVELIN, 2000). No entanto, tem sido observado que a cana-de-açúcar apresenta baixa eficiência de uso de N (FRANCO et al., 2011; TRIVELIN 2000). Portanto, aumentar a eficiência de uso de N, além de trazer economia, pode contribuir com menor impacto ambiental causado pela adubação.

O emprego de isótopos estáveis vem sendo utilizado cada vez mais em várias áreas de pesquisa. A utilização do ^{15}N como marcador propicia melhor entendimento do ciclo do N no sistema solo-planta (TRIVELIN, 2000).

A dificuldade na determinação da quantidade de N do fertilizante, recuperada pelas plantas pode ser solucionada com o uso da técnica isotópica do N marcado, que utiliza isótopos estáveis de N (^{14}N e ^{15}N) como traçador. O uso é baseado no fato de que o ^{14}N e o ^{15}N ocorrem naturalmente numa razão quase constante de 273:1 átomos (0,3663% em átomos de ^{15}N ou 3,663 ppm). Logo é possível traçar o movimento dos dois isótopos de N (^{14}N e ^{15}N), simultaneamente, fornecendo informações acerca do sistema e estimando as taxas de transformações do N (FRANCO et al., 2011). A principal vantagem é a possibilidade de distinção do N na planta, do proveniente do solo e o N do fertilizante (TRIVELIN et al., 1994)

A utilização de BPCV tem demonstrado resultados positivos na promoção de diversas culturas como abacaxi, que apresentaram aumento de 19% na massa fresca de frutos inoculados (Werber et al., 2004). Em trigo, a inoculação promoveu incremento de 45% na produtividade (Sala et al., 2007) e, em milho, foi observado aumento médio de 26% na produção de grãos (CANELLAS et al., 2015).

A aplicação de BPCV em condições controladas em cana-de-açúcar tem demonstrado efeito significativo na fase inicial de crescimento em mudas pré-brotadas (GIRIO et al., 2015). Os autores observaram aumento na velocidade de brotação e no acúmulo da matéria seca da parte aérea. E ao avaliarem a aplicação de BPCV em conjunto com fertilizantes nitrogenados em solos com baixa fertilidade natural, verificaram que a inoculação associada ao fornecimento de N favorece o crescimento inicial da parte aérea e do sistema radicular.

A utilização de BPCV vem sendo testada em nível de campo e tem proporcionado aumento na produtividade de colmos e matéria seca total similares aos encontrados com a utilização de 120 kg ha⁻¹ de N (SCHULTZ et al., 2012; 2014).

As substâncias húmicas (SH) têm reconhecido efeito sobre a promoção do crescimento de plantas, que pode ocorrer pelo aumento na absorção de nutrientes ao aumentar a atividade da H⁺ATPases, nas raízes das plantas (CANELLAS et al., 2002). Além disso, podem promover o desenvolvimento de raízes pela atividade auxínica (CANELLAS et al., 2006; LAZZARINI, 2014). Quaggiotti et al. (2004), ao estudarem os efeitos fisiológicos das SH em milho, verificaram que houve aumento do influxo de nitrato nas raízes das plantas tratadas com AH. SCHULTZ et al. (2014), não observaram alterações significativas na quantidade de ¹⁵N em plantas inoculadas com BPCV. Os autores sugeriram que o efeito observado sobre a produção está mais associado à promoção do crescimento do que com a fixação biológica de nitrogênio. A análise de ¹⁵N ainda não foi utilizada para avaliação da inoculação em conjunto de BPCV e AH. O objetivo deste trabalho é, portanto, avaliar a eficiência da recuperação de N, utilizando K¹⁵NO₃ em cana-de-açúcar inoculada com BPCV, na presença ou não de AH.

2. Material e métodos

Foi realizado um experimento em casa de vegetação no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes –RJ. Neste experimento, foi utilizada a variedade RB 988503 produzida e cedida pela biofábrica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Leonel Miranda, proveniente da técnica de micropropagação.

O solo foi classificado como Cambissolo Flúvico Distrófico de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação do Solo e apresentou as seguintes características na camada arável (0-0,2 m): pH = 5,2; P = 3 (mg/dm⁻³); K⁺ = 0,06 (cmol_cdm⁻³); Ca⁺⁺ = 0,8 (cmol_cdm⁻³); Mg⁺⁺ = 0,4 (cmol_cdm⁻³); Al⁺⁺⁺ = 0,5 (cmol_cdm⁻³); H⁺ +Al = 3,8 (cmol_cdm⁻³); Na⁺ = 0,02 (cmol_cdm⁻³); C = 14,2 (g dm⁻³); MO = 17,4 (g/dm⁻³); CTC: 51 (mmol_c dm⁻³); V: 25 %. A análise foi realizada em amostra composta (10 subamostras) e em laboratório de rotina (UFRRJ, Campus Campos dos Goytacazes - RJ), de acordo com a metodologia preconizada pela Embrapa (1999).

O delineamento utilizado foi em blocos inteiramente casualizados com quatro repetições. A saturação por bases foi elevada para 60% com aplicação de calcário dolomítico PRNT 80%. Quinze dias após a adição do corretivo, realizou-se a adubação de plantio com P₂O₅ e KCl, nas doses equivalentes a 80 Kg ha⁻¹ de P e 60 Kg ha⁻¹ de K, respectivamente. O solo foi enriquecido com nitrogênio marcado com nitrato de potássio (K¹⁵NO₃) 10% de átomos de ¹⁵N, com uma dose equivalente a 126,13 mg de N/vaso. As mudas de cana-de-açúcar foram transplantadas em vasos de 5kg, sendo considerada cada planta por vaso uma parcela. Um dia após o transplântio das plântulas foi realizada a aplicação dos tratamentos: (i) suspensão de bactérias diazotróficas endofíticas 10⁸ células mL⁻¹ de (*Herbaspirillum seropedicae* HRC 54, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* 103 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5) – (ii) ácidos húmicos extraídos de vermicomposto de torta de filtro (100 mg de AHL⁻¹) – (iii) bactérias diazotróficas endofíticas na presença de ácidos húmicos. Tais tratamentos foram comparados com o controle (vi) no qual foi aplicado somente água. A irrigação foi controlada a fim de evitar perdas de N por lixiviação. Foram avaliados a altura das plantas, o teor de clorofila utilizando o SPAD, a massa fresca e seca da parte aérea e das raízes. A colheita do experimento foi realizada após 60 dias do plantio.

As amostras da planta e do solo rizosférico e não rizosférico foram secas em estufa (65° C) e, em seguida, moídas em moinho de bola para as determinações de N-total, e a abundância de ¹⁵N (% de átomo de ¹⁵N) foi determinada utilizando em um espectrômetro de massa automatizado acoplado a um analisador de ANCA-GSL N (Sercon CO., UK), no Laboratório de Isótopos Estáveis no CENA-USP.

A recuperação percentual do nitrogênio (R) foi determinada pela expressão:

$$R \% = (N_{ppf}/N_{af}) * 100(1)$$

Sendo:

$$N_{ppf} = \{(A - C)/(B - C)\} * NT \quad (2)$$

$$N_{pof} = NT - N_{PPF} \text{ (mg/parcela)} \dots \dots \dots (3)$$

Onde: N_{ppf} - Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante miligrama por parcela (mg/parcela). A e B abundância de ^{15}N (% átomos) da planta e do nitrato de potássio, respectivamente, C abundância natural de ^{15}N (0,366% de átomos), NT é o conteúdo de nitrogênio da planta (mg/parcela) e Naf a quantidade de K^{15}NO_3 aplicado (mg/parcela). N_{pof} o nitrogênio na planta proveniente de outras fontes (mg/parcela).

Os dados referentes ao acúmulo de N na parte aérea e raiz proveniente do fertilizante (N_{ppf}) e de outras fontes (N_{pof}) foram submetidos à análise de variância, as médias com diferença significativa pelo teste F foram comparadas pelo teste de Fisher (LSD), com significância de 5% a partir do uso do *software Sisvar*® versão 5.1. Os resultados relativos ao crescimento e recuperação de nitrogênio foram submetidos à análise de variância e os efeitos dos tratamentos foram desdobrados em contrastes médios.

Tabela1. Esquema da análise de variância para análise de dados dos experimentos realizados em casa de vegetação

Causas da Variação	GL
Bloco	3
Tratamentos	3
Resíduo	9

3. Resultados

As análises de variância do experimento são mostradas nas Tabelas 2 e 3. E os resultados das médias das características analisadas na Tabela 4. A aplicação isolada de BPCV resultou no aumento de 24% de N na planta, proveniente de outras fontes (N_{pof}) na parte aérea. Esse valor foi o mesmo (25%) com a inoculação em conjunto com AH, enquanto que o uso isolado de AH esse aumento foi de somente 8,5% quando comparado ao controle (Tabela 5). Em relação ao N na planta proveniente do fertilizante (N_{ppf}) na parte aérea, a aplicação de AH apresentou aumento de 8% em relação ao controle. O uso de BPCV em conjunto ou não com AH não alterou os valores de N_{ppf} em relação ao controle.

Os contrastes médios que representam a diferença em real magnitude entre a média dos tratamentos comparados para as características morfológicas, conteúdo e recuperação de N são mostrados na Tabela 6.

Foram observadas diferenças significativas no crescimento, como na massa fresca e seca da cana-de-açúcar com a aplicação de AH isolada ou em conjunto com BPCV. No entanto não foram observados efeitos significativos em relação à altura e Spad (Tabela 6).

O contraste que compara a matéria fresca e seca da parte aérea da cana-de-açúcar, entre o controle e a aplicação isolada de AH (AH *versus* controle), apresentou incrementos de 8,4 e 20,1 %, respectivamente (Tabela 6). Em relação ao conteúdo de N, o AH promoveu aumento de 5,3%. O uso isolado do AH proporcionou recuperação do N na raiz, apresentando o incremento de 17,44% em relação ao controle.

Para a aplicação isolada de BPCV, foram observados incrementos significativos em relação ao controle (BPCV *versus* controle), para os parâmetros massa fresca e seca da parte aérea, os incrementos foram 7,4 e 22,3%, respectivamente, em comparação ao controle (Tabela 6). Em relação ao conteúdo de N o incremento foi de 8,8%. A aplicação isolada de BPCV não apresentou ganhos significativos na parte aérea e raiz em relação à recuperação de N (Tabela 6).

A aplicação em conjunto de AH e BPCV apresentou incrementos significativos em relação ao controle (AH+BPCV *versus* controle), para os parâmetros massa fresca e seca da parte aérea, os incrementos foram 10,8 e

28,6%, respectivamente, em comparação ao controle (Tabela 6). Em relação ao conteúdo de N, o incremento foi de 9,5%. A aplicação em conjunto de AH e BPCV não apresentou ganhos significativos na parte aérea e raiz em relação à recuperação de N (Tabela 6).

A aplicação isolada de AH foi significativamente superior à aplicação em conjunto com as BPCV (AH *versus* AH+Bac), em relação à recuperação de N, os incrementos foram de 10,8 e 54,6% na parte aérea e raiz, respectivamente. Na comparação entre a aplicação conjunta de AH e BPCV com a inoculação isolada das BPCV (Bac *versus* AH+Bac), não foram observados incrementos significativos (Tabela 6).

Tabela 2. Análise da variância do experimento em blocos inteiramente casualizados realizada em casa de vegetação

Altura			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,01	1,42 ^{ns}
Tratamentos	3	0,004	0,65 ^{ns}
Resíduo	9	0,007	
Spad			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	2,65	1,73
Tratamentos	3	0,56	0,36 ^{ns}
Resíduo	9	1,54	
Peso fresco parte aérea			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	3,22	1,20 ^{ns}
Tratamentos	3	14,55	5,40*
Resíduo	9	2,70	
Peso seco parte aérea			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,093	0,21 ^{ns}
Tratamentos	3	3,67	8,11**
Resíduo	9	0,45	
Peso fresco Raiz			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,39	0,40 ^{ns}
Tratamentos	3	1,42	1,46 ^{ns}
Resíduo	9	0,98	
Peso seco Raiz			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,34	2,70 ^{ns}
Tratamentos	3	0,31	2,49 ^{ns}
Resíduo	9	0,12	

Razão raiz / parte aérea			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,004	3,85 ^{ns}
Tratamentos	3	0,02	18,20 ^{**}
Resíduo	9	0,001	
Conteúdo de nitrogênio			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	108,60	10,83 ^{**}
Tratamentos	3	271,92	27,13 ^{**}
Resíduo	9	10,02	
Recuperação nitrogênio- Parte aérea			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	2,50	0,61 ^{ns}
Tratamentos	3	13,02	3,18 ^{ns}
Resíduo	9	4,08934	
Recuperação nitrogênio- Raiz			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,20	1,14 ^{ns}
Tratamentos	3	3,33	18,71 ^{**}
Resíduo	9	0,17	

^{ns}Não Significativo, *Significativo a 5%, **Significativo a 1%, de probabilidade pelo teste F

Tabela 3. Análise da variância do acúmulo de N na parte aérea e raiz proveniente do fertilizante (Nppf) e de outras fontes (Npof)

Parte aérea- Nppf			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,92	0,14 ^{ns}
Tratamentos	3	13,63	2,05 ^{ns}
Resíduo	9	6,62	
Parte aérea - Npof			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	76,53	4,01*
Tratamentos	3	1086,95	56,82**
Resíduo	9	19,12	
Raiz- Nppf			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	0,46	1,08 ^{ns}
Tratamentos	3	4,79	11,01**
Resíduo	9	0,43	
Raiz - Npof			
Causas da Variação	GL	QM	F
Bloco	3	4,60	0,84 ^{ns}
Tratamentos	3	27,23	5,04*
Resíduo	9	5,44	

^{ns}Não Significativo, *Significativo a 5%, **Significativo a 1%, de probabilidade pelo teste F

Tabela 4. Característica de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e acúmulo de nitrogênio na cana-de-açúcar em resposta à aplicação associada ou não de ácidos húmicos (AH), bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).

Tratamento ⁽¹⁾	Características de crescimento e acúmulo de nitrogênio							Conteúdo de N PA ⁽⁴⁾
	Parte aérea ⁽²⁾				Sistema radicular ⁽³⁾			
	ALT	SPAD	MFPA	MSPA	MFR	MSR	RPA	
	cm		g/planta		g/planta			mg/planta
(-)	112,8	41,4	40,9	7,8	12,9	4,5	0,6	189,2
AH	120,5	41,0	44,4	9,3	11,5	4,5	0,5	199,2
Bac	116,8	40,5	44,0	9,5	11,9	4,7	0,5	205,9
AH+Bac	114,3	40,9	45,4	10,0	12,5	4,0	0,4	207,2

⁽¹⁾Tratamentos: (-):controle; AH: ácido húmico; BPCV: bactérias promotoras do crescimento vegetal; AH+BPCV: ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal. ⁽²⁾Parte aérea ALT: altura; SPAD; MFPA: matéria fresca parte aérea. MSPA: matéria seca parte aérea.

⁽³⁾ Sistema radicular, MFR: matéria fresca raiz; MSR: matéria seca raiz; RPA: razão entre raiz e parte aérea. ⁽⁴⁾ Conteúdo de nitrogênio na parte aérea

Tabela 5. Acúmulo de N na parte aérea e raiz proveniente do fertilizante (Nppf) e de outras fontes (Npof), na variedade de cana-de-açúcar RB 988503 adubada com $K^{15}NO_3$, aos 60 dias após aplicação isolada ou em conjunto de ácidos húmicos (AH) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)

	Parte aérea			
	Controle	AH	Bac	AH+Bac
		mg/planta		
Nppf	39,4 ab	42,5 a	38,3 b	39,0ab
Incremento em relação ao controle %	-	7,8	-	-
C.V. (%)	6,47			
		mg/planta		
Npof	144,0 c	156,2 b	178,6 a	180,0 a
Incremento em relação ao controle(%)	-	8,5	24,0	25,0
C.V. (%)	2,67			
		Raiz		
		mg/planta		
Nppf	6,5 ab	7,4 a	5,5 bc	5,0 c
Incremento em relação ao controle %	-	13,8	-	-
C.V. (%)	10,8			
		mg/planta		
Npof	28,2 b	29,1 ab	32,3 a	26,0 b
Incremento em relação ao controle(%)	-	-	14,5	-
C.V. (%)	8,07			

Médias seguidas de letra diferente diferem pelo teste LSD Fisher ($p < 0,05$). Incrementos em relação ao controle foram calculados por: $100 \cdot (x-y)/y$, sendo x a média do tratamento e y a média do controle. CV (%) é o coeficiente de variação.

Tabela 6. Contrastes médios, incrementos médios relativos, quadrado médio do resíduo (QMR) e coeficiente de variação (CV) para as características de crescimento parte aérea, sistema radicular, conteúdo de N, recuperação de nitrogênio em cana-de-açúcar em resposta à aplicação de ácidos húmicos (AH) e bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV).

Contrastes médios (incrementos relativos) ⁽⁶⁾											
FV ⁽¹⁾	GL	Parte aérea ⁽²⁾				Sistema radicular ⁽³⁾			Conteúdo de N PA ⁽⁴⁾	Recuperação de ¹⁵ N ⁽⁵⁾	
		ALT -cm-	SPAD	MFPA -----g/planta-----	MSPA	MFR ----g/planta----	MSR	RPA	mg/planta	PA -----%-----	RAIZ
AH vs (-)	1	1,68 ^{ns}	0,21 ^{ns}	8,77*	10,77**	3,57 ^{ns}	0,09 ^{ns}	19,24**	20,01*	2,80 ^{ns}	9,23*
		-	-	(8,4)	(20,1)	-	-	(-17,2)	(5,3)	-	(17,4)
Bacvs (-)	1	0,45 ^{ns}	1,05 ^{ns}	6,82*	13,13**	1,93 ^{ns}	0,30 ^{ns}	15,02*	55,64**	1,59 ^{ns}	4,10 ^{ns}
		-	-	(7,4)	(22,3)	-	-	(-15,5)	(8,8)	-	-
AH+Bacvs (-)	1	0,05 ^{ns}	0,43 ^{ns}	14,55**	21,66**	0,29 ^{ns}	4,10 ^{ns}	53,95**	64,97**	0,39 ^{ns}	17,17**
		-	-	(10,8)	(28,6)	-	-	(-31,0)	(9,5)	-	(-24,0)
AH vsAH+Bac	1	0,99 ^{ns}	0,033 ^{ns}	0,66 ^{ns}	2,34 ^{ns}	2,21 ^{ns}	2,09 ^{ns}	5,1*	3,70 ^{ns}	5,29*	51,61**
	-	-	-	-	-	-	-	(-3,9)	-	(10,8)	(54,6)
BacvsAH+Bac	1	0,16 ^{ns}	0,116 ^{ns}	1,35 ^{ns}	1,32 ^{ns}	0,85 ^{ns}	4,72 ^{ns}	7,01*	0,10 ^{ns}	0,41 ^{ns}	4,48 ^{ns}
	-	-	-	-	-	-	-	(-0,6)	-	-	-
QMR		0,007	1,54	2,69	0,45	0,97	0,13	0,001	10,02	4,09	0,18
CV (%)		7,27	3,03	3,76	7,36	8,1	8,04	7,08	1,58	6,48	8,58

⁽¹⁾FV: (-): controle; AH: ácido húmico; BAC: bactérias; AH+BAC: ácidos húmicos e bactérias. ⁽²⁾Parte aérea ALT: altura; SPAD; MFPA: matéria fresca parte aérea. MSPA: matéria seca parte aérea. ⁽³⁾Sistema radicular, MFR: matéria fresca raiz; MSR: matéria seca raiz; RPA: razão entre raiz e parte aérea. ⁽⁴⁾Conteúdo de nitrogênio. ⁽⁵⁾ Recuperação de Nitrogênio. ⁽⁶⁾ incrementos relativos: $100 \cdot (x-y)/y$, sendo x a média do tratamento inoculado e y a média do controle. ^{ns}não significativo *, **: significativo a 5 e 1 % pelo teste F.

4. Discussão

No presente trabalho foi avaliado o uso de AH e BPCV aplicados isoladamente ou em conjunto em plântulas micropropagadas de cana-de-açúcar. Foram analisadas características de crescimento, acúmulo de N, além da recuperação de fertilizante nitrogenado marcado.

Foi observado que a aplicação de AH isoladamente ou em conjunto com as BPCV promoveram incrementos significativos para massa fresca e seca da parte aérea. Marques Jr. et al. (2008) verificaram que as SH promoveram o crescimento de parte aérea em mini toletes de cana-de-açúcar em magnitude similar. O aumento na promoção do crescimento radicular foi atribuído a uma ação do tipo auxínica das SH que estimulam a H⁺-ATPase na membrana celular que gera o gradiente eletroquímico e energiza transportadores secundários (Canellas et al., 2002). Com isso, a absorção de nutrientes como nitrato é favorecida estimulando o crescimento vegetativo (MORA et al., 2010). O aumento na absorção de N influenciado pelo uso AH foi confirmado no presente trabalho, pois as plantas inoculadas apresentaram um incremento na recuperação no valor de 17,4% quando comparado ao controle.

As SH e AH aplicados em conjunto com ureia nas folhas de cana-de-açúcar têm demonstrado efeito na absorção N (LEITE 2016). O autor realizou dois experimentos em casa de vegetação e verificou que as SH e AH proporcionaram rápida absorção da ureia, favorecendo o aproveitamento do N fertilizante. Na média dos dois experimentos, a recuperação de ¹⁵N e eficiência de uso do N (EUN) foi maior para a ureia+ SH (49%) em comparação com ureia + AH (43%) e apenas ureia (37%). Além disso, o uso do AH induziu alterações no metabolismo da planta avaliada pelas mudanças no conteúdo de carboidrato total e proteína.

O mesmo autor testou a aplicação no solo de doses ureia e doses de SH em soqueiras de cana-de-açúcar em condições de campo. Verificou-se que a mistura ureia+SH melhorou simultaneamente a produção de cana-de-açúcar e a EUN. Porém, em relação à recuperação de ¹⁵N, não encontrou diferenças entre tratamentos com ureia e ureia + SH na análise feita no fim do ciclo da cultura. A explicação pode ser o fato de a cultura da cana-de-açúcar apresentar de 40 a 70% do seu conteúdo total de N proveniente do fertilizante nitrogenado na fase inicial de crescimento em cana planta e primeira soca, respectivamente, enquanto na

colheita, o N fertilizante participa 10% na cana planta e 10 a 35% na soqueira (FRANCO et al. 2011).

Isso evidencia a importância de aumentar a eficiência de uso do N. O tratamento inoculado com AH apresentou 7,8% a mais de Nppf, quando comparado ao controle (Tabela 5). O incremento proporcionado pelo uso do AH na recuperação de N mostra que o seu emprego é promissor na cultura da cana-de-açúcar, visando a diminuição da contaminação ambiental através de perdas por lixiviação, além do ganho econômico.

Verificou-se, ainda, que a utilização de AH na presença de BPCV aplicados em milho aumenta a eficiência de uso de N em condições stress hídrico, e que em condições regulares de pluviosidade, ocorre aumento na EUN até a dose de 75 kg ha⁻¹ (CANELLAS et al., 2015).

No presente trabalho, ao analisar o efeito do AH, verificou-se que o mesmo promoveu uma maior recuperação de nitrogênio, ou seja, apresentou aumento na recuperação de N, sendo o incremento no valor de 17,4% quando comparado ao controle.

5. Conclusões

O uso de AH e BPCV em cana-de-açúcar é tecnologia que proporciona incrementos na massa seca da parte aérea, além de aumento no conteúdo de nitrogênio. A aplicação de AH mostrou-se eficiente na recuperação de N na variedade testada RB988503.

6. Referências

Canellas, L.P., Silva, S.F., Olk, D., Olivares, F.L. (2015). Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 13:146-153.

Canellas, L.P.; Zandonadi, D.B.; Olivares, F.L.; Façanha, A.R. (2006). Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas: o estímulo às H⁺-ATPases. In: Fernandes, M.S. (Org.). Nutrição mineral de plantas. Viçosa: *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 1:175-195.

Canellas, L.P.; Façanha, A.O.; Olivares, F.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*, London, 130:1951-1957.

Franco, H.C.J.; Otto, R.; Faroni, C.E.; Vitti, A.C.; Oliveira, E.C.A; Trivelin, P.C.O. (2011). Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer in Brazilian field conditions. *Field Crops Research*, Amsterdam, 121:29-41.

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 Agropecuária Brasileira*, 50 (1):33-43.

LAZZARINI, P.R.C. (2014). *Substâncias húmicas extraídas de turfa associadas com Nureia: influência no crescimento da cana-de-açúcar e nas transformações do N no solo*. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) –Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 82 p.

Leite, J.M. *Eficiência agrônômica da adubação nitrogenada associada à aplicação de substâncias húmicas em cana-de-açúcar*. 2016. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba – SP - Universidade de São Paulo, 130p.

Marques, Jr. R. B., Canellas, L. P., 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 Ciência do Solo*, Viçosa, MG. 32:1121-1128.

Mora, V.; Bacaicoa, E.; Zamarreño, A.M.; Aguirre, E.; Garnica, M.; Fuentes, M.; García-Mina, J.M. (2010). Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, Jena. 167:633-642.

Oliveira ALM, Canuto EL, Urquiaga S, Reis VM, Baldani JI. (2006). Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. *Plant Soil*.;284:23-32.

Quaggiotti, S.; Rupert, 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.). *Journal of Experimental Botany*, Oxford, 55:803-813.

Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biological & Biochemistry*, Oxford, 34:1527-1536.

Sala, V. M. R.; Cardos, E. J. R. N.; Freitas, J. G.; Silveira, A. P. D. (2007). Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 42 (6):833-842.

Schultz, Nivaldo, Silva, Jeferson Alves da, Sousa, Jailson Silva, Monteiro, Rafael Cassador, Oliveira, Renan Pedula, Chaves, Valfredo Almeida, Pereira, Willian, Silva, Marinete Flores da, Baldani, José Ivo, Boddey, Robert Michael, Reis, Veronica Massena, & Urquiaga, Segundo. (2014). Inoculation of sugar cane with diazotrophic bacteria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 38(2):407-414.

Schultz, N.; Morais, R. F.; Silva, J. A.; Baptista, R. B.; Oliveira, R. P.; Leite, J. M.; Pereira, W.; Carneiro Jr., J. B.; Alves, B. J. R.; Baldani, J. I.; Boddey, R. M. (2012). Urquiaga, S.; Reis, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 47 (2):261–268.

Trivelin, P.C.O. *Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar: três casos estudados com o traçado ¹⁵N*. 2000. Tese (Livre-Docência) –Piracicaba - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 143p.

Werber, O. B.; Terão, D.; Rocha, L. S.; Correia, D.; Santo, F. J. S. (2004). Efeito de bactérias diazotróficas na produção de abacaxizeiro “*cayennechampac*”, sob irrigação, em dois níveis de adubação Nitrogenada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26 (2):249-253.

4. CONCLUSÕES

O uso de bioestimulante a base de ácidos húmicos e bactérias promotoras do crescimento vegetal é eficaz no aumento de produção de cana-de-açúcar pois proporcionou incrementos na produção de colmos sem modificar as características industriais da cana-de-açúcar;

A aplicação via foliar do bioestimulante é mais eficiente que a aplicação no sulco. E a melhor época de aplicação é aos 60 dias após a emergência;

A utilização de AH e BPCV na cultura da cana-de-açúcar é uma estratégia viável que promoveu ganhos na produção de colmos além de aumento na recuperação de N. Essa tecnologia é uma ferramenta que pode ser utilizada visando ganhos econômicos e ambientais em locais onde é empregado pouco uso de fertilizantes nitrogenados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, N.O., Medici, L.O., Olivares, F.L., Dobbss, L.B., Torres-Netto, A., Silva, S.F., Novotny, E.H., Canellas, L.P. (2015). Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugar cane treated with humic acid and endophytic diazotrophic bacteria. *Annals of Applied Biology*. 168:203-213.

Baldani, V.L.D. (1986). *Efeito da inoculação de Herbaspirillum spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica*. (Tese de Doutorado) - Seropédica –RJ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 238p.

Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Canellas, L.P., BRESSAN-SMITH, R., OLIVARES, F.L. (2010). Growth promotion of pineapple 'Vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, Viçosa, 34 (5):1593-160.

Bashan, Y., De-Bashan, L.E., Prabhu, S.R., Hernandez, J.P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). (A Marschner Review). *Plant and Soil*. 378: 1-33.

Blanco, Y., Blanch, M., Piñón, D., Legaz, M., Vicente, C. (2005). Antagonism of *Gluconacetobacter diazotrophicus* (a Sugarcane Endosymbiont) against

Xanthomonas albilineans (Pathogen) Studied in Alginate-Immobilized Sugarcane Stalk Tissues. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 99 (4): 366–371.

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.

Canellas, L.P., Silva, S.F., Olk, D., Olivares, F.L. (2015). Foliar application of *Herbaspirillum seropedicae* and humic acid increase maize yields. *Journal of Food, Agriculture and Environment*. 13:146-153.

Canellas, L.P., Olivares, F.L (2014). Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 1:1-11.

Canellas, L.P., Martínez-Balmori, D., Médici, L.O., Aguiar, N.O., Campostrini, E., Rosa, R.C., Façanha, A., Olivares, F.L. (2013). 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., Olivares, F.L., Okorokova-Facanha, 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.

Cantarella, H., Raij, B. Van. (1985). Adubação nitrogenada no estado de São Paulo. In: simpósio sobre adubação nitrogenada no Brasil, Ilhéus, 1985. *Anais CEPLAC/Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*. Ilhéus.47- 79.

Date, R.A. (2001). Advances in inoculant technology: a brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41:321–325.

Dillewijn, C. Van. (1952). Botany of sugarcane. Waltham: Chronica Botânica, 371p. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de pesquisa de Solos. *Sistema Brasileiro de Classificação de solos*. Rio de Janeiro, 412p.

Espironelo, A., Oliveira, H., Nagai, V. (1980). Efeitos da adubação nitrogenada em cana-de-açúcar (cana-planta) em anos consecutivos de plantio. II. Resultados de 1976/78 e conclusões finais 1974/78. *Bragantia*. Campinas. 39:27-38.

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.

FAO. The state of food and agriculture (2012) *FAO. Agricultural Series*. n.36. ISSN 0081-4539.

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.

Ikeda, A.C., Bassani, L.L., Adamoski, D., Stringari, D., Cordeiro, V.K., Glienke, C., Steffens M.B.R., Hungria, M., Galli-Terasawa, L.V. (2013). Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. *Microbial Ecology*. 65:154-160.

James, E.K, Olivares, F.L. (1998). Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Review of Plant Science*. 17:77-119.

Lima, E., Boddey, R. M., Dobereiner, J. (1987). Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biology Biochemistry*. 19:165-170.

Marques, JR. (2010). *Uso de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas na produção de milho e cana-de-açúcar*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Programa de Pós – Graduação - Campos Dos Goytacazes, RJ - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 93p.

Marques, Jr. R. B., Canellas, L. P., 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 Ciência do Solo*, Viçosa, MG. 32:1121-1128.

Melo, A. P., Olivares, F.L., Médici, L.O., Torres-Neto, A., Dobbss, L.B., Canellas, L.P. (2017). Mixed rhizobia and inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4:6.

Mercante, F.M., Hungria, M., Mendes, I.C., Júnior, F.B.R. (2011). Estratégias para aumentar a eficiência de inoculantes microbianos na cultura da soja. *Comunicado técnico 169 Embrapa*. Dourados, MS

Nardi, S., Carletti, P., Pizzeghello, D., Muscolo, A. (2009). Biological activities of humic substances. In: Senesi N, Xing B, Huang Pm (eds) *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. Fundamentals and impact of mineral-organicbiota interactions on the formation, transformation, turnover, and storage of natural nonliving organic matter (NOM). Wiley, Hoboken.2:305–339.

Nebbioso A., Piccolo A., Lamshoft M., Spiteller M. (2014). Molecular characterization of an end-residue of humeomics applied to a soil humic acid. *RSC Advances*. 4: 23658-23665.

Neilands, J. B., Leong, S. A. (1986). Siderophorus in relation to plant growth and disease. *Annual Reviews in Plant Physiology*. 37:187-208.

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 boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*. 183:100-108.

Olivares, F.L.; Reis, V.M. & Façanha, A.R. (2000) *The role of endophytic diazotrops in sugarcane rootmorphogenesis and development*. In: Finan, T.M.; O'brian, M.R.; Layzell, D.B., Vessey, J.K. & Newton. W., eds. *Nitrogen fixation: Global perspectives*. Oxon, CAB International, 476-477.

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*. 242:205-215.

Rayle, D. L.; Cleland, R. E. (1992). The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* 99: 1271–1274.

Rodriguez, H., Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. 17:319-339.

Schultz, N.; Morais, R. F.; Silva, J. A.; Baptista, R. B.; Oliveira, R. P.; Leite, J. M.; Pereira, W.; Carneiro Jr., J. B.; Alves, B. J. R.; Baldani, J. I.; Boddey, R. M. (2012). Urquiaga, S.; Reis, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47 (2):261–268.

Stephens, J.H.G, Rask, H.M. (2000). Inoculant production and formulation. *Field Crops Research* 65:249–258.

Urquiaga, S., Cruz, K. H. S., Boddey, R. M. (1992). Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Science Society of America Journal*. 56:105-114.

Vaughan, D., Malcolm, R. E. (1985). Influence of humic substances on growth and physiological processes. In: Vaughan, D., Malcolm, R.E. (eds.) *Soil Organic Matter and Biological Activity*. Boston: MA, USA, 37-75.

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

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., Santos, M.P., Dobbss, L.B., Olivares, F.L., Canellas, L.P., Binzel, M.L., Okorokova-Façanha, A.L., Façanha, A.R. (2010). Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 231 (5):1025-1036.