

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELE PALUDO

INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA  
EM MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (CULTIVARES RB)

CURITIBA

2025

FRANCIELE PALUDO

INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA EM  
MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (CULTIVARES RB)

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de concentração em Produção Vegetal, Setor de Ciências agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bernal Filho

CURITIBA

2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Paludo, Franciele

Inoculação com *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (cultivares RB) / Franciele Paludo. – Curitiba, 2025.

1 recurso online: PDF.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal).

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bessalho Filho

1. Cana-de-açúcar - Cultivo. 2. Mudas. 3. Crescimento (Plantas). 4. Fertilizantes nitrogenados. I. Bessalho Filho, João Carlos. II. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal). III. Título.

Bibliotecária: Elizabeth de Almeida Licke da Luz CRB-9/1434

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FRANCIELE PALUDO**, intitulada: **INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* E ADUBAÇÃO NITROGENADA EM MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR (CULTIVARES RB)**, sob orientação do Prof. Dr. JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 07 de Março de 2025.

Assinatura Eletrônica

07/03/2025 18:29:45.0

JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

07/03/2025 11:46:29.0

BRUNO PORTELA BRASILEIRO

Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

07/03/2025 11:47:56.0

RICARDO AUGUSTO DE OLIVEIRA

Coorientador(a)

Assinatura Eletrônica

07/03/2025 12:37:01.0

GILDEMBERG AMORIM LEAL JUNIOR

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS)

Assinatura Eletrônica

03/04/2025 10:24:51.0

VOLNEI PAULETTI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

*Aos meus amados pais Lucimara Rossatto Paludo e Gilisberto Luiz Paludo*

*Ao meu companheiro Marcos Estevan Kraemer de Moura*

*Por todo amor, dedicação e força neste momento*

*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, proteção, coragem e iluminação divina. À Santo Antônio, São Bento e Nossa Senhora por toda intercessão, guiança e discernimento. Obrigada por me abençoarem com tanto e com tantas pessoas queridas!

Aos meus pais, Lucimara Rossatto Paludo e Gilisberto Luiz Paludo por todo amor, apoio e compreensão dos muitos momentos de ausência e principalmente, por plantarem o amor aos estudos em mim. Eu amo vocês!

Ao meu companheiro de vida Marcos Estevan Kraemer de Moura, que foi essencial para a realização deste trabalho. Muito obrigada por toda ajuda, companheirismo, apoio, amor e compreensão. É um prazer compartilhar a vida com você! Ao nosso amado cachorro Chico, que esteve presente em todos os momentos, por tanto amor, alegria e parceria na hora da escrita e coleta de solo.

Aos meus sogros Marlene Maria Kraemer de Moura e João Amauri de Moura que possibilitaram e apoiaram a minha vida em Curitiba, bem como, me acolheram como filha. A Marina Souto Ferreira, minha irmã de alma que mesmo longe se fez presente e foi essencial em tantos momentos.

Ao meu querido orientador João Carlos Bespalhok Filho, por aceitar me orientar e passar ensinamentos que foram de grande valia e que lembrarei sempre. Obrigada por possibilitar oportunidades profissionais e pessoais na minha caminhada, ser um grande incentivador e acreditar no meu trabalho. Obrigada por proporcionar um ambiente de trabalho tranquilo e de crescimento.

Ao professor Bruno Portela Brasileiro por todo auxílio, atenção e dedicação com o trabalho. Ao professor Volnei Pauletti que tirou tantas dúvidas, contribuiu com os experimentos e sempre esteve disponível para ajudar. Ao professor Átila Francisco Mogor que me mostrou uma nova forma de enxergar os meus resultados e contribuiu muito para o meu conhecimento.

Aos professores de banca de qualificação (Ricardo Augusto de Oliveira, Bruno Portela Brasileiro, Átila Francisco Mogor, Alessandra Ferreira Ribas, João Carlos Bespalhok Filho), pré-defesa (Ricardo Augusto de Oliveira, Bruno Portela Brasileiro, Volnei Pauletti, João Carlos Bespalhok Filho) e defesa de doutorado (Ricardo Augusto de Oliveira, Bruno Portela Brasileiro, Volnei Pauletti, Gildemberg Amorim Leal Junior, João Carlos Bespalhok Filho), por todo conhecimento transmitido, educação na fala, valiosos apontamentos e pelas

conversas que foram edificantes, tornando o trabalho com maior qualidade e contribuindo para o meu crescimento profissional.

Á Laudiane Zanella e Mariana Almeida Franca, por acreditarem em mim e no meu trabalho, por possibilitarem aprendizados e crescimento profissional. Obrigada por cada conversa, apoio, ensinamento e pela oportunidade de estar na Multiplicare Plantas!

Aos técnicos de laboratório Maria Emília Kudla, Roger Raupp Cipriano e Fabiana Gavelaki que tanto me auxiliaram nos experimentos, pelas conversas, pelo apoio e incentivo. Á Roxana Beatriz Ribeiro Chaves pelo cultivo dos inóculos e apontamentos importantes nos trabalhos.

Aos colegas de pesquisa Marcela Zanatta, Grace Romani e Gabriel Lara que foram gentis, acolhedores e apoiadores em tantos momentos. Á Isabella Wustro, minha conterrânea que esteve presente contribuindo nas avaliações dos experimentos e que sempre foi muito solícita e resolutiva.

Á Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Produção Vegetal pela oportunidade de estar realizando um sonho, pelo convívio com profissionais de excelência e por todo o conhecimento adquirido ao longo desses anos.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos e a RIDESA por fomentar e proporcionar todos os recursos necessários para a realização do projeto. Ao Laboratório de Fixação de Nitrogênio e ao professor Emanuel Maltempi de Souza, por gentilmente ceder as cepas bacterianas para a realização dos experimentos e por indicar a aluna para cultivo dos inóculos.

A todos os professores e orientadores que estiveram em minha caminhada. É com cada conhecimento, vivência e conversa que me formo. Aos profissionais da educação deixo o meu agradecimento!

*A todos o meu mais sincero obrigada!*

*A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.*

*O que ela quer da gente é coragem.*

(João Guimarães Rosa. 1956. pag. 293)

## RESUMO

A produção de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar apresenta vantagens, sobretudo pela redução na quantidade de colmos exigidos para o plantio. Ademais, a inoculação dessas mudas com bactérias diazotróficas, como *Azospirillum brasilense*, contribui para o aumento do potencial agrônômico das plantas em condições de campo. Outro fator que potencializa o desenvolvimento vegetal é a adubação nitrogenada. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e a absorção de nutrientes em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com as cepas HM053 ou Ab-V5; Ab-V6 e Ab-V7 (Triazo) de *A. brasilense* e adubadas com diferentes doses de nitrogênio. O experimento 1 foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. Sendo avaliadas as cultivares de cana-de-açúcar RB867515, RB006970, RB966928, RB056351 e RB016916 cultivadas em sistema MPB e inoculadas com HM053 ou Triazo. Para o experimento 2 as mudas da cultivar RB867515 foram cultivadas em sistema de MPB com delineamento inteiramente casualizado. O substrato foi inoculado com a cepa HM053 e adubado com nitrogênio em quatro doses (0, 30, 60, 200 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato). As avaliações de porcentagem de brotação e de crescimento radicular foram realizadas aos 7 dias após inoculação (experimento 1) e as demais avaliações de crescimento vegetal e nutricional foram avaliadas aos 50 (experimento 1 e 2) dias após inoculação. Para o experimento 1, a inoculação (Triazo ou HM053) resultou em aumento na massa seca da parte aérea nas cultivares RB006970 e RB056351. A maior porcentagem de brotação ocorreu nas cultivares RB867515 e RB966928 inoculadas com Triazo. Triazo reduziu o comprimento da raiz e da raiz fina em RB056351. Foi observada interação entre cultivar e inoculante. RB867515 apresentou efeito positivo com Triazo; RB056351 se beneficiou da inoculação com a cepa HM053 e RB016916 não apresentou efeito positivo com a inoculação. Independente da cultivar, a inoculação com HM053 resultou em redução do teor de ferro nas mudas e proporcionou redução do teor de potássio na cultivar RB056351. As plantas da cultivar RB016916 inoculadas (Triazo ou HM053) apresentaram menor conteúdo de cálcio, magnésio e manganês em comparação com plantas controle. No experimento 2, ocorreu aumento significativo em diâmetro do colmo, número de folhas e volume da raiz em plantas inoculadas, independentemente da aplicação de adubação nitrogenada, quando comparadas com plantas controle. Ocorreu aumentos nutricionais (teor de fósforo e potássio) em plantas inoculadas e adubadas, contudo os teores de ferro e cobre nas plantas, assim como, o conteúdo desses micronutrientes reduziram quando as plantas foram inoculadas, independentemente da adubação nitrogenada. Devido a uma interação cepa-genótipo, as cultivares responderam de forma diferente. MPBs da cultivar RB867515 inoculadas com HM053 e adubadas com nitrato de amônio foram beneficiadas, principalmente nas menores doses.

Palavras-chave: MPB; bactérias promotoras de crescimento vegetal; *Saccharum* spp.; mini-tolete; inoculante.

## ABSTRACT

The production of pre-sprouted sugarcane seedlings (PSS) offers advantages, primarily due to the reduction in the number of stalks required for planting. Additionally, inoculation of these seedlings with diazotrophic bacteria such as *Azospirillum brasilense* contributes to enhanced agronomic performance under field conditions. Another factor that can promote plant development is nitrogen fertilization. The objective of this study was to evaluate growth and nutrient uptake in pre-sprouted sugarcane seedlings inoculated with *A. brasilense* strains HM053 or a mixture of strains Ab-V5, Ab-V6, and Ab-V7 (Triazo), and subjected to different nitrogen fertilization rates. Experiment 1 was conducted in a completely randomized design with a factorial arrangement. The sugarcane cultivars RB867515, RB006970, RB966928, RB056351, and RB016916 were evaluated under the MPB system and inoculated with either HM053 or Triazo. In Experiment 2, seedlings of cultivar RB867515 were cultivated in the MPB system using a completely randomized design. The substrate was inoculated with strain HM053 and fertilized with nitrogen at four different rates (0, 30, 60, and 200 mg N kg<sup>-1</sup> of substrate). The evaluations of sprouting percentage and root growth were performed at 7 days after inoculation (Experiment 1), while the remaining assessments related to plant growth and nutritional status were conducted at 50 days after inoculation (Experiments 1 and 2). In Experiment 1, inoculation with either Triazo or HM053 resulted in increased shoot dry matter in cultivars RB006970 and RB056351. The highest sprouting percentage was observed in cultivars RB867515 and RB966928 inoculated with Triazo. However, Triazo reduced root length and fine root length in RB056351. A significant interaction between cultivar and inoculant was observed. Cultivar RB867515 showed a positive response to Triazo, RB056351 benefited from inoculation with HM053, while RB016916 did not respond positively to inoculation. Regardless of cultivar, inoculation with HM053 resulted in reduced iron content in the seedlings and decreased potassium content in RB056351. Inoculated RB016916 plants (with either Triazo or HM053) showed lower calcium, magnesium, and manganese contents compared to the uninoculated control plants. In Experiment 2, significant increases in stalk diameter, leaf number, and root volume were observed in inoculated plants, regardless of nitrogen fertilization, when compared to the control. Nutritional enhancements (increased phosphorus and potassium content) were observed in plants that were both inoculated and fertilized. However, iron and copper contents, as well as the total accumulation of these micronutrients, decreased in inoculated plants regardless of nitrogen application. Due to strain-genotype interactions, the cultivars responded differently. MPB seedlings of cultivar RB867515 inoculated with HM053 and fertilized with ammonium nitrate showed enhanced performance, particularly at lower nitrogen doses.

Keywords: PSS; plant growth promoting bacteria; *Saccharum* spp., mini-sett; inoculant.

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 3-1** Representation of the experiment conducted with pre-sprouted sugarcane seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense* ..... 48
- Fig. 3-2** Biometric variables of sugarcane seedlings inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053. Interaction between cultivar and inoculant factors. (a) sprouting percentage. (b) shoot dry matter. (c) thin root length (> 0.5 to < 1.5 mm). Sprouting percentage and thin roots length were evaluated at 7 DAI. Shoot dry matter variable was evaluated at 50 DAI. Columns represent the mean value and bars represent the standard deviation. The columns followed by equal letters compare inside each cultivar do not differ according to Tukey's test at 5% significance ..... 53
- Fig. 3-3** Nutritional variables of sugarcane seedlings inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053. Interaction between cultivar and inoculant factors. (a) content Potassium. (b) Calcium extraction. (c) Magnesium extraction. (d) Manganese extraction. Variables were evaluated at 50 DAI in the aerial part of seedlings sugarcane. Columns represent the mean value and bars represent the standard deviation. The columns followed by equal letters compare inside each cultivar do not differ according to Tukey's test at 5% significance..... 54
- Fig. 4-1** Representação da condução do experimento mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com *Azospirillum brasilense* HM053 e adubadas com nitrogênio. A cultivar utilizada foi RB867515. rpm – rotação por minuto. UFC – unidade formadora de colônias. Fonte da adubação nitrogenada – nitrato de amônio. DIC – delineamento inteiramente casualizado. DAI – dias após inoculação. 66
- Fig. 4-2** Representação dos tratamentos aplicados nas mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar cultivar RB867515. Tratamento Controle: sem adubação nitrogenada e sem inoculação de *A. brasilense* cepa HM053. Tratamento 0NHM: com inoculação da cepa HM053 e 0 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato. Tratamento 30NHM: com inoculação da cepa HM053 e aplicação de 30 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato. Tratamento 60NHM: com inoculação da cepa HM053 e aplicação de 60 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato. Tratamento 200NHM: com inoculação da cepa HM053 e aplicação de 200 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato..... 67

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 3-1.</b> Summary of analysis of variance and mean squares of growth variables of sugarcane plants grown in PSS system, inoculated with <i>A. brasilense</i> : Triazo and HM053. ....	50
<b>Table 3-2.</b> Summary of analysis of variance and mean squares of variables evaluated in roots of sugarcane sprouts, inoculated with <i>A. brasilense</i> : Triazo and HM053. ....	51
<b>Table 3-3.</b> Summary of analysis of variance and mean squares of nutrient content aerial part of sugarcane plants grown in PSS system, inoculated with <i>A. brasilense</i> : Triazo and HM053. ....	51
<b>Table 3-4.</b> Summary of analysis of variance and mean squares of extraction of nutrients by plants grown in PSS system and inoculated with <i>A. brasilense</i> : Triazo and HM053. ....	51
<b>Table 3-5.</b> Mean values of significant biometric and nutrient content in aerial part of sugarcane seedlings grown in a PSS system for the inoculant (Triazo and HM053) factor. ....	52
<b>Tabela 4-1.</b> Representação dos grupos de médias comparados na análise de contrastes ortogonais. ....	69
<b>Tabela 4-2.</b> Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para as variáveis biométricas de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com <i>A. brasilense</i> cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg <sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada). ....	71
<b>Tabela 4-3.</b> Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para o teor de nutrientes de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com <i>A. brasilense</i> cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg <sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada). ....	71
<b>Tabela 4-4.</b> Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para nutrientes exportados de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com <i>A. brasilense</i> cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg <sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada). ....	71

**Tabela 4-5.** Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para índice de uso eficiente de nutrientes de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com *A. brasilense* cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg<sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada).....72

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

- $^{11}\text{C}$  – Carbono radiativo-11
- $^{52}\text{Mn}^{2+}$  – Manganês radioativo
- $^{65}\text{Zn}$  – Zinco radioativo
- ABA – Ácido abscísico
- ADP+P – Adesinadifosfato
- AIA – Ácido indol-3-acético
- AIB – Ácido indol-butírico
- AIL – Ácido indol-3-láctico
- ANOVA – Análise de variância
- ANPII – Associação Nacional de Promoção e Inovação da Indústria de Biológicos
- APA – Altura parte aérea
- ASR – Área superficial da raiz
- ATP – Adenosina trifosfato
- B.O.D – Demanda Biológica de Oxigênio
- BPCV – Bactérias promotoras de crescimento vegetal
- Ca – Cálcio
- CFU – Colony forming units
- CGM – Catálogo Global de Microrganismos
- cm – Centímetro
- $\text{cm}^2$  – Centímetro quadrado
- $\text{cm}^3$  – Centímetro cúbico
- CNPTIA – Centro Nacional de Pesquisa em Tecnologia em Informática para a Agricultura
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento
- CR – Comprimento da raiz
- Cu – Cobre
- CV – Coeficiente de variação
- DAI – Dias após inoculação
- DC – Diâmetro do colmo
- DF – Degrees of freedom
- $\text{dm}^3$  – Densímetro cúbico
- EDA<sup>R</sup> – Resistente à etilenodiamina
- FBN – Fixação biológica de nitrogênio

Fe – Ferro

Fe<sup>+2</sup> – Ferro ferroso

Fe<sup>+3</sup> – Ferritina

FV – Fator de variação

g – Grama

GL – Graus de liberdade

GOGAT – Glutamato sintetase

GS – Glutamina sintetase

ha – Hectare

*ipdC* – Indol-3-piruvato descarboxilase

IPyA – Indol-3-piruvato

K – Potássio

kg – Quilograma

KPa – Quilo pascal

kW – Quilowatt

L – Litro

LPSN – Lista de nomes procarióticos com posição na nomenclatura

MAPA – Ministério da Agricultura e Pecuária

Mg – Magnésio

mg – Miligrama

mm – Milímetro

Mn – Manganês

Mo – Molibdênio

Mpb – Mega pares de bases

MPB – Mudas pré-brotadas

MSPA – Massa seca parte aérea

MSR – Massa seca raiz

N – Nitrogênio

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

Na<sup>R</sup> – Resistente ao ácido nalidíxico

NF – Número de folhas

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> – Amônio

*Nif<sup>C</sup>* – Gene de fixação de nitrogênio consecutivo

NL – Number of leave  
ns – Não significativo  
NO – Óxido nítrico  
P – Fósforo  
AFA – Ácido fenilacético  
PGPB – Plant growth promoting bactéria  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PIB – Produto Interno Bruto  
PMG – Programa de melhoramento genético  
PR – Paraná  
PSS – Pre-sprouted seedlings  
RDM – Root dry matter  
RF – Raiz fina  
RIDESA – Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético  
RL – Root lenght  
RMF – Raiz muito fina  
RPM – Rotação por minuto  
RSA – Root surface area  
RV – Root volum  
SD – Stem diameter  
SDM – Shoot dry matter  
Sm<sup>R</sup> – Estreptomicina  
SP – Sprouting porcentagem  
ssp. – Espécie  
SV – Sources of variation  
T – Toneladas  
TAM – Triptofolamina  
TR – Thin root  
UFC – Unidades formadoras de colônias  
UFPR – Universidade Federal do Paraná  
UFV – Universidade Federal de Viçosa  
UNICA – União da Indústria de Cana-de-Açúcar e Bioenergia  
US\$ – Dólar americano  
VR – Volume da raiz

VTR – Very thin root

Zn – Zinco

## LISTA DE SÍMBOLOS

() – Parêntese

% – Porcentagem

\$ – Cifrão

~ – Til

? – Ponto de interrogação

± – Mais ou menos

°C – Graus Celsius

µm – Micrómetro

nmol – Nanomolar

µg – Micrograma

® – Marca registrada

™ – Trademark

< – Menor que

> – Maior que

x – Multiplicação

α – Alfa

= – Igual

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1 PANORAMA DA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL E NO MUNDO.....	22
2.1.1 Características da cana-de-açúcar e cultivares RB.....	23
2.1.2 Mudanças pré-brotadas de cana-de-açúcar (MPB) .....	25
2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV) EM MPB DE CANA-DE-AÇÚCAR .....	26
2.2.1 Adubação nitrogenada e BPCV em cana-de-açúcar.....	27
2.3 <i>Azospirillum brasilense</i> : IDENTIFICAÇÃO, MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E BENEFÍCIOS QUANDO ASSOCIADO COM GRAMÍNEAS .....	29
2.3.1 <i>Azospirillum brasilense</i> cepa HM053 .....	31
2.3.2 <i>Azospirillum brasilense</i> cepas Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 .....	33
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>34</b>
<b>3 CAPÍTULO I GROWTH AND NUTRITIONAL CONTENT OF PRE-SPROUTED SEEDLINGS OF FIVE SUGARCANE CULTIVARS INOCULATED WITH <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7, AND HM053 STRAINS .....</b>	<b>44</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>44</b>
3.1 INTRODUCTION.....	45
3.2 MATERIALS AND METHODS .....	47
3.2.1 <i>Azospirillum brasilense</i> strains.....	47
3.2.2 Sugarcane cultivars, inoculation conditions and growth in PSS system .....	47
3.2.3 Growth and nutritional variables of sugarcane seedlings grown the plants in a PSS system.....	49
3.2.4 Statistical analyses.....	50
3.3 RESULTS.....	50
3.4 DISCUSSION.....	54
<b>CONCLUSIONS.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>58</b>
<b>4 CAPÍTULO II MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM <i>Azospirillum brasilense</i> HM053 E ADUBADAS COM NITROGÊNIO.....</b>	<b>63</b>

<b>RESUMO.....</b>	<b>63</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	63
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.2.1 Condições de crescimento da cepa HM053 de <i>Azospirillum brasilense</i> .....	64
4.2.2 Inoculação, adubação e condições de crescimento das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar.....	65
4.2.3 Variáveis de crescimento e nutricionais avaliadas em MPB de cana-de-açúcar.....	67
4.2.4 Análises estatísticas .....	68
4.3 RESULTADOS .....	69
4.4 DISCUSSÃO .....	72
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
<b>6 REFERÊNCIAS GERAIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7 APÊNDICE A – PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MUDAS PRÉ-BROTADAS .....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa posição de destaque no cenário mundial quando o tema é a cana-de-açúcar. O país é reconhecido como o maior produtor do mundo dessa cultura agrícola, além de liderar na produção e exportação de açúcar, posiciona-se como o segundo maior produtor de etanol (FAOSTAT, 2024; UNICA, 2024c). Na safra 2023/24, a produtividade da cultura alcançou 85 toneladas por hectare (CONAB, 2024). Adicionalmente, 33% da energia renovável ofertada no Brasil provém da cana-de-açúcar. A cadeia produtiva também exerce um papel significativo na geração de empregos, empregando cerca de 2 milhões de trabalhadores e representa aproximadamente 2% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro (UNICA, 2024c).

O sistema de plantio da cana-de-açúcar é realizado atualmente na forma tradicional, sendo plantados toletes com 3 gemas por sulco. Uma alternativa que tem ganhado destaque é a produção de mudas pré-brotadas (MPB), que consiste na produção de mudas em sistema controlado a partir de uma única gema. O uso de MPB de cana-de-açúcar tem sido amplamente adotado por viveiristas, biofábricas na formação de viveiros básicos e produtores que fazem o plantio em sistema de MEIOSI (Método inter-rotacional ocorrendo simultaneamente). Esse sistema permite uma redução significativa na quantidade de colmos utilizados para o plantio, além de favorecer o manejo fitossanitário e a aplicação de produtos biológicos ainda nas fases iniciais do desenvolvimento da cultura (Landell *et al.*, 2012; May; Ramos 2019; Silva *et al.*, 2024).

Produtos biológicos são insumos derivados de organismos vivos ou de seus metabólitos, empregados com a finalidade de favorecer o desenvolvimento vegetal. Entre esses produtos, destacam-se os inoculantes, os quais contêm bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), capazes de atuar na melhoria da nutrição e no desempenho fisiológico das plantas. Alguns trabalhos estudaram a inoculação de BPCV em MPB de cana-de-açúcar, principalmente utilizando as bactérias: *Azospirillum brasilense*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense*, *Paraburkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae* e *H. rubrisubalbicans* (Gírio *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2020; Matoso *et al.*, 2021; Moura *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2019; dos Santos *et al.*, 2019).

Uma das estratégias para a redução das doses de N utilizadas e/ou maior eficiência do uso de N pela cultura da cana-de-açúcar é a inoculação de BPCV, que pode contribuir para a otimização da assimilação de nutrientes e reduzir a necessidade de adubação convencional (Paiva *et al.*, 2024). Além das bactérias diazotróficas contribuírem com a FBN (fixação

biológica de nitrogênio) também favorecem uma melhor absorção do N presente no solo (Carvalho *et al.*, 2014). Em MPB o uso da adubação nitrogenada com BPCV é um assunto a ser estudado, devido as variações nas doses ( $\sim 50$  e  $120 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e fontes utilizadas (Cipriano *et al.*, 2021; Gírio *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2020). Essas variações influenciam o desempenho da cultura e a sustentabilidade do sistema, exigindo práticas que otimizam o uso do fertilizante sem comprometer a produtividade e o meio ambiente.

A cepa HM053 de *A. brasilense* possui uma mutação natural que a torna excretora de amônio (Machado *et al.*, 1991) e produz altos níveis de auxina (Housh *et al.*, 2021b). Esta cepa demonstrou promover benefícios quando inoculada em plantas como setária (Pankievicz *et al.*, 2015), milho (Pedrosa *et al.*, 2019), cevada (Santos *et al.*, 2017a) e trigo (Santos *et al.*, 2017b). No ano de 2025 a empresa Bioma em parceria com o grupo de pesquisa do Núcleo de Fixação de Nitrogênio da Universidade Federal do Paraná, lançaram o primeiro inoculante comercial com a cepa HM053, indicada para plantas de milho. Até o momento, MPB de cana-de-açúcar inoculadas com a cepa HM053 não foram avaliadas quanto as variáveis de crescimento e nutricionais. Outras cepas diazotróficas de destaque desta espécie são Ab-V5; Ab-V6 e Ab-V7, as quais fazem parte de inoculantes comerciais e foram avaliadas em inoculação de cana-de-açúcar a campo (Lopes *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2019).

O uso de produtos biológicos na agricultura tem apresentado crescimento contínuo nos últimos anos, impulsionado pela busca por alternativas sustentáveis e eficientes para a melhoria da produtividade agrícola. De acordo com a ANPII (2024), em 2023, aproximadamente 2% das vendas de inoculantes no Brasil foram destinadas à cultura da cana-de-açúcar. As cepas Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* compõem inoculantes comerciais indicados para a cultura da cana-de-açúcar, assim como outras bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Nesse contexto, a adoção de mudas pré-brotadas (MPB) por viveiristas e biofábricas tem ampliado a demanda por BPCV que atuem de forma eficiente em um período relativamente curto, em torno de 50 dias.

A eficiência dos BPCV pode variar de acordo com as características fisiológicas e agrônomicas das diferentes cultivares de cana-de-açúcar. No Brasil, a cultivar RB867515 destaca-se como a mais cultivada, enquanto a RB966928 ocupa a terceira maior área de plantio (Braga Junior *et al.*, 2023). Além disso, as cultivares RB056351 e RB006970 têm sido introduzidas em áreas de renovação dos canaviais de usinas sucroenergéticas, e a cultivar RB016916 foi recentemente registrada. Diante desse cenário, torna-se essencial avaliar a eficiência dos BPCV em diferentes cultivares, considerando suas particularidades e o potencial impacto no desenvolvimento inicial das MPB.

Dada a relevância das cultivares RB no cultivo da cana-de-açúcar e o potencial da multiplicação por MPB como técnica promissora para a propagação da cultura, além dos benefícios já documentados de BPCV, como *A. brasilense* cepas Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 e HM053 em gramíneas, formulou-se a hipótese de que a inoculação dessas cepas promoverá aumentos significativos no crescimento vegetal e na eficiência de absorção de nutrientes pelas mudas de cana-de-açúcar. Adicionalmente, a combinação da inoculação com a cepa HM053 e a adubação nitrogenada potencializará o desenvolvimento das plantas e a assimilação de nutrientes. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e a absorção de nutrientes em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com as cepas HM053 ou Ab-V5; Ab-V6 e Ab-V7 (Triazo) de *A. brasilense* e adubadas com diferentes doses de nitrogênio.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PANORAMA DA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL E NO MUNDO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é a espécie agrícola mais produzida no mundo seguido do milho, arroz e trigo (FAOSTAT, 2024). Adicionalmente, constitui a base para a produção de açúcar em mais de 100 países ao redor do mundo (UNICA, 2024a). No que diz respeito à produção por continente, a América é responsável por 53% da produção mundial de cana-de-açúcar, seguida pela Ásia (40%), África (5%) e Oceania (1,8%) (FAOSTAT, 2024).

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China que ocupam respectivamente, o segundo e o terceiro lugar, com base na média de produção dos anos de 2012 a 2022 (FAOSTAT, 2024). Além disso, o Brasil é líder mundial na exportação e produção de açúcar e ocupa também, a segunda posição na produção de etanol (UNICA, 2024c).

No Brasil a safra 2023/24 destacou-se pela alta produção de cana-de-açúcar, totalizando 713,2 milhões de toneladas em uma área de 8,3 milhões de hectares, com uma produtividade de 85,6 toneladas por hectare. Além da expressiva produtividade, o país atingiu um recorde na produção de açúcar, estimado em 45,7 milhões de toneladas e alcançou 29,7 bilhões de litros de etanol produzidos (CONAB, 2024). As regiões com maior produção de cana-de-açúcar do Brasil são: Sudeste com uma produção de 469 milhões de toneladas, Centro-oeste (145 milhões de toneladas), Nordeste (56,5 milhões de toneladas), Sul (38,7 milhões de toneladas) e a região Norte (3,9 milhões de toneladas) (CONAB, 2024).

Na safra 2023/24 os países Índia e Paquistão sofreram com condições climáticas, reduzindo as suas produções de cana-de-açúcar e favorecendo a exportação pelo Brasil. Portanto, o Brasil exportou 35,2 milhões de toneladas de açúcar, sendo os principais destinos a China, Índia e Indonésia. Adicionalmente, a exportação de etanol foi de 2,6 bilhões de litros, sendo os principais compradores Coréia do Sul, Estados Unidos e Países Baixos (CONAB, 2024).

A cultura da cana-de-açúcar possui um impacto econômico de US\$ 40 bilhões de PIB no mundo, correspondendo a cerca de 2% do PIB brasileiro. A cultura também é destaque com 33% da energia renovável ofertada no Brasil. Além disso, a cadeia sucroenergética gera emprego para 2,2 milhões de pessoas no país considerando os empregos diretos e indiretos, além de aproximadamente 70 mil produtores rurais de cana-de-açúcar independentes. Estima-se que durante a safra 2023/24, 269 usinas estavam em funcionamento (UNICA, 2024c) e 92,4% da colheita foi realizada de forma mecanizada (CONAB, 2024).

Destaca-se a versatilidade do setor canavieiro, tendo a cana-de-açúcar como matéria prima para o açúcar, etanol anidro e hidratado. Adicionalmente, também pode ser utilizada para gerar produtos como: bioeletricidade, etanol de 2ª geração, biogás, biometano, plástico verde, fertilizante natural e ração para alimentação animal (UNICA, 2024b). Diante do exposto, nota-se a relevância que a cultura da cana-de-açúcar desempenha no Brasil e no mundo, sendo necessário destinar esforços contínuos em pesquisas para o desenvolvimento da cultura.

### 2.1.1 Características da cana-de-açúcar e cultivares RB

As plantas de cana-de-açúcar são pertencentes a ordem Poales, família Poaceae, de gênero *Saccharum*, sendo híbridos interespecíficos, monocotiledôneas e com mecanismo fotossintético C4 (Medeiros *et al.*, 2020). O genoma da planta é complexo e extenso (~3,000 Mbp), com diferentes níveis de ploidia e ocorrência de aneuploidia (Batista *et al.*, 2022; Tomkins *et al.*, 1999). Tais características possibilitam diferentes ciclos de cultivo (precoce, médio e tardio), além de conferir adaptabilidade ao ambiente e respostas diferentes aos manejos agrônômicos.

As cultivares modernas originaram de espécies selvagens (*S. spontaneum*, *S. robustum*), espécies cultivadas (*S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule*) e gêneros (*Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya*) (Medeiros *et al.*, 2020). O centro de

origem da cultura é incerto, contudo, entende-se que provavelmente seja o sudeste Asiático, mais precisamente a ilha de Nova Guiné (Miranda *et al.*, 2008).

A cana-de-açúcar apresenta em sua fenologia, quatro principais fases de desenvolvimento: brotação, perfilhamento, crescimento e maturação dos colmos, os quais são colhidos ao final dessa etapa. O clima favorável para a produção de cana-de-açúcar é na região tropical, com temperaturas que variam entre 20 e 38 °C e ambiente úmido ao longo do ciclo de cultivo. A cana-de-açúcar é cultivada e se adapta a diferentes tipos de solos, como: argissolo, nitossolo, latossolo roxo e latossolo de textura média (Marin, 2022).

No Brasil estão registrados 228 cultivares de cana-de-açúcar até o segundo semestre de 2024 (MAPA, 2024). A cultivar RB867515 é a mais cultivada do Brasil, sendo muito utilizada na região centro-sul, seguida da região norte-nordeste (Braga Junior *et al.*, 2023). Foi lançada em 1997 pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar da Universidade Federal de Viçosa/Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (PMGCA/UFV/RIDESA), proveniente de um policruzamento (RB72454 x ?). Ganhou destaque por se adaptar ao cultivo em solos com baixa fertilidade, com restrições hídricas e por manter bom desempenho agrônômico. Possui velocidade de crescimento rápido, maturação médio/tardio e é indicada para ambientes restritivos (Oliveira; Barbosa; Daros, 2021).

A cultivar RB966928 (RB855156 x RB815690) ocupa a terceira maior área de cultivo no Brasil e na região centro-sul (Braga Junior *et al.*, 2023). Lançada em 2010 pela Universidade Federal do Paraná (PMGCA/UFPR/RIDESA), ganhou notoriedade por sua elevada adaptabilidade à colheita mecanizada. Possui como características a campo: rápido crescimento, maturação precoce e exige ambientes de média fertilidade (Oliveira; Barbosa; Daros, 2021).

As cultivares RB056351 (RB855206 x ?) e RB006970 (RB855536 x SP80-1816) foram lançadas em 2021 também pelo PMGCA/UFPR/RIDESA. A cultivar RB056351 possui rápido crescimento, maturação precoce/médio e exige ambientes de média a alta fertilidade. A cultivar RB006970 caracteriza-se por velocidade de crescimento médio, maturação precoce/média, sendo indicada para ambientes de média a alta fertilidade (Oliveira; Barbosa; Daros, 2021). Devido ao curto tempo de lançamento dessas cultivares, não é possível apresentar dados sobre área de plantio e produtividade, contudo são genótipos promissores e que estão ocupando parte das áreas de renovação dos canaviais das usinas sucroenergéticas. A cultivar RB016916 (SP80-3280 x RB855589), foi desenvolvida pelo

PMGCA/UFPR/RIDESA. É caracterizada por uma velocidade de crescimento médio, maturação precoce, elevado teor de sacarose e média restrição ambiental (Daros *et al.*, 2020).

Para otimizar o potencial das cultivares, é importante realizar manejos adequados desde o plantio até a colheita. O plantio dessa cultura a campo é realizado tradicionalmente por meio de toletes de cana-de-açúcar com três gemas, utilizando em média 12 a 15 gemas por metro de sulco (May; Ramos, 2019). Devido à grande quantia de colmos necessários para o plantio, falhas no canavial e doenças sendo transmitidas pelos colmos, se faz necessário buscar opções de plantio (Otto *et al.*, 2022). O sistema de mudas pré-brotadas (MPB) apresenta-se como um aprimoramento no plantio da cana-de-açúcar com benefícios de redução do número de colmos necessários e facilidade no controle de doenças (Landell *et al.*, 2012).

### 2.1.2 Mudanças pré-brotadas de cana-de-açúcar (MPB)

Mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar são produzidas a partir de mini-toletes com  $\pm 3$  cm cada com uma gema (Landell *et al.*, 2012). O uso de gemas isoladas é discutido na literatura desde a década de 70 (Silva, 1976 *apud* Stolf; Lee, 1990; Ramaiah *et al.*, 1977 *apud* May; Ramos, 2019; Stolf; Lee, 1990). Contudo, Landell *et al.* (2012), propuseram o sistema de MPB associado a ambientes controlados. A técnica consiste em obter mini-toletes com uma gema, acomodar as mesmas em bandejas com substrato comercial e subsequentemente manter em ambiente controlado com uma temperatura média de 32 a 36 °C, até o brotamento das gemas. Em seguida, cada broto é transferido para tubetes com substrato comercial e passam por duas fases de aclimatização das mudas.

Com o uso do sistema de MBP para a produção de mudas ocorre uma redução significativa, de aproximadamente 90%, do número de colmos necessários para a formação de um canavial. O sistema de plantio convencional da cana-de-açúcar utiliza cerca de 20 toneladas por hectare de colmos (May; Ramos, 2019; Otto *et al.*, 2022), no entanto, no sistema MPB são utilizadas apenas 2 toneladas por hectare de colmos. Sendo direcionados uma maior quantia de colmos para as usinas sucroenergéticas, evitando falhas no canavial, possibilitando o controle fitossanitário e o uso de produtos biológicos logo no início do cultivo (Landell *et al.*, 2012; Otto *et al.*, 2022).

A produção de MPB pode ser utilizada por biofábricas na multiplicação de mudas para a formação de viveiros, assim como os viveiristas se beneficiam da obtenção de mudas de qualidade. Outra utilização das MPB está no uso em sistema de plantio MEIOSI para a

introdução de novas cultivares a campo, assim como, em áreas de expansão, renovação e em casos de falhas no plantio convencional, possibilitando a manutenção e a distribuição espacial do canavial (Silva *et al.*, 2024).

Alguns fatores são fundamentais ao realizar o plantio por meio de MPB. A irrigação é essencial para o estabelecimento das mudas no campo, além disso, a população e o arranjo das plantas devem ser cuidadosamente planejados. Outro ponto importante a ser considerado é a forma de plantio, que pode ser manual ou mecanizado. A escolha entre essas opções impacta a eficiência do plantio, o custo e o tempo de execução. A preparação do solo também deve ser adequada a cada tipo de plantio, pois os métodos manuais ou mecanizados exigem tratamentos diferentes no solo para garantir que as mudas se desenvolvam de forma ideal. Por fim, todos esses fatores influenciam diretamente os custos do processo de plantio, que se torna mais alto quando comparado ao sistema tradicional (Silva *et al.*, 2024).

Alguns trabalhos demonstram a efetividade do uso de MPB a campo, como maior estabilidade no processo de colheita para a altura de corte e índice de danos - apresentando o menor índice de colmos com defeitos (Gírio *et al.*, 2019), o uso de MPB promoveu maior receita para usinas e fornecedores no estado de São Paulo (Amorim *et al.*, 2020), o rendimento de colmos e o teor total de açúcar recuperável foi similar nos dois métodos de plantio (tradicional e MPB) (Otto *et al.*, 2022) e o uso de MPB reduz o tráfego de maquinário a campo (Souza *et al.*, 2022).

## 2.2 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV) EM MPB DE CANA-DE-AÇÚCAR

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são um grupo bacteriano heterogêneo, de vida livre e quando associadas com plantas promovem benefícios (Dutta; Podile, 2010). Podem colonizar a superfície das raízes (bactérias associativas), os espaços intercelulares (bactérias endofíticas) e as células (bactérias simbióticas) (Souza; Ambrosini; Passaglia, 2015). As formas de promoção do crescimento vegetal podem ser diretas (disponibilizando nutrientes e modulando hormônios vegetais) ou indiretas (promovendo a tolerância a estresses bióticos e abióticos) (Reed; Glick, 2023).

O termo BPCV surgiu na literatura científica na década de 1980 (Jaoudé *et al.*, 2023), desde então os estudos desses microrganismos aumentaram. A plataforma Scopus permite em sua página de busca colocar a palavra-chave de interesse e analisar resultados, gerando uma breve bibliometria. Sendo assim, no ano de 2024 foram publicados 1850

documentos na plataforma com o termo BPCV. O Brasil ocupa a quarta posição no ranking de países com publicações referente ao assunto, com 933 documentos ficando atrás da Índia, China e Estados Unidos, respectivamente (dados referentes aos anos 1947 a 2024).

Algumas espécies bacterianas foram avaliadas em MPB de cana-de-açúcar como: *Azospirillum brasilense*, *Bacillus aryabhattai*, *B. caribensis*, *Pseudomonas* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense*, *Paraburkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingens* (Gírio *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2020; Matoso *et al.*, 2021; May *et al.*, 2021; Moura *et al.*, 2019; Reis *et al.*, 2019; Rossetto *et al.*, 2021; dos Santos *et al.*, 2019). Tais trabalhos relataram aumento no diâmetro do colmo, massa seca das raízes, volume e área, principalmente das raízes finas, índice de velocidade de brotação, altura da parte aérea, comprimento das raízes e no acúmulo de nitrogênio.

MPB inoculada com BPCV é um assunto ainda pouco explorado pela ciência. Na plataforma Scopus quando os dois termos estão associados (MPB e BPCV), os resultados mostram que a primeira publicação ocorreu em 2015 e contando com apenas uma publicação nos anos 2018, 2019, 2021, 2022 e duas publicações em 2024. Os principais autores são majoritariamente brasileiros.

O *A. brasilense* é uma das BPCV mais estudadas (Cassán *et al.*, 2020). Quando o termo de pesquisa utilizado na plataforma Scopus é *Azospirillum brasilense*, o primeiro artigo nesta plataforma foi publicado em 1975 e em 2024 contou com 135 publicações, sendo 92,8% em formato de artigo e 30% na área da agricultura e biologia. Quando o assunto é *A. brasilense* na plataforma Scopus, o Brasil ocupa o primeiro lugar em números de publicações com 632 documentos, seguido dos Estados Unidos e Rússia.

Os números caem consideravelmente, sendo quase inexistentes, quando os termos de busca são *Azospirillum brasilense* e MPB na plataforma Scopus. Somente no ano de 2017 foi publicado um artigo sobre o assunto. Compreender a interação complexa entre microrganismos benéficos e plantas, em conjunto com técnicas de manejo podem colaborar com a redução no uso de fertilizantes químicos e aumentar a produtividade. Os números demonstram a necessidade de estudar toda a complexidade de MPB de cana-de-açúcar inoculadas com BPCV, principalmente com *A. brasilense*.

### 2.2.1 Adubação nitrogenada e BPCV em cana-de-açúcar

O Brasil ocupa a quarta posição no ranking mundial do consumo de fertilizantes nitrogenados, atrás de países como a China, Índia e Estados Unidos. Apesar do Brasil ser um grande consumidor de adubação nitrogenada, não é autossuficiente na produção do nitrogênio, o que exige a importação desse insumo da China, Rússia, Catar, Omã, Nigéria, entre outros países. Em 2023, foram importados cerca de 11 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados para atender à demanda agrícola brasileira (Globalfert, 2024).

A resposta à adubação depende de vários fatores como a cultivar, o ciclo de cultivo (cana-planta ou cana-soca) e das condições edafoclimáticas. Estudos comprovam que a cana-de-açúcar absorve somente cerca de 20-40% do N aplicado a campo (Franco *et al.*, 2011; Otto *et al.*, 2016; Shultz; Reis; Urquiaga, 2015). Outro aspecto relevante é a fonte de nitrogênio utilizada na adubação, uma vez que a cana-de-açúcar tem preferência pela absorção de amônio em relação ao nitrato (Robinson *et al.*, 2011). Assim, além de garantir o uso eficiente do N pela planta, é essencial considerar as perdas de nitrogênio para o ambiente, que representam um desafio adicional no manejo sustentável da cultura.

A aplicação de nitrogênio em cana-de-açúcar a campo no Brasil é significativamente menor em comparação a outros países produtores, variando entre 60-120 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (Otto *et al.*, 2016; Spironello *et al.*, 1997). Esse resultado deve-se aos avanços em estudos relacionados à adubação nitrogenada e ao desenvolvimento de cultivares de cana-de-açúcar melhoradas e adaptadas às condições específicas de cultivo no país. Em contraste, China e Índia utilizam doses superiores variando de 400 a 750 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (Robinson *et al.*, 2011; Otto *et al.*, 2016).

Uma das estratégias para a redução e maior eficiência do uso de N na cultura da cana-de-açúcar é a inoculação de BPCV. Urquiaga *et al.* (2012) demonstraram que cultivares de cana-de-açúcar cultivadas a campo foram capazes de obter em média 40 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> pela FBN. Pereira *et al.* (2021) também observaram que plantas da cultivar RB92579 absorveram cerca de 31% de N via FB. Contudo, outros estudos demonstram pouco ou nenhuma FBN em cana-de-açúcar a campo (Gava *et al.*, 2019; Scudeletti *et al.*, 2023), assim como em MPB inoculada com um mix de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Nitrospirillum amazonense* e *Paraburkholderia tropica*) (Santos *et al.*, 2019).

A adubação nitrogenada em sistema de MPB e em viveiros de cana-de-açúcar é utilizada, assim como, na literatura é possível encontrar alguns trabalhos que adubaram com N as MPB cultivadas em vasos e realizaram a inoculação de BPCV (Cipriano *et al.*, 2021; Gírio *et al.*, 2015). Contudo, as fontes de adubação nitrogenada e as doses são variáveis. A

recomendação para o cultivo de MPB é para aplicar nitrato de cálcio (14% de N) sendo 250 g em 20 L de água, pulverizando a cada semana nas mudas (Landell *et al.*, 2012), em caso de MPB que receberam adubação nitrogenada e inoculação com bactérias diazotróficas as doses variam entre 50 e 120 mg kg<sup>-1</sup> de solo (Cipriano *et al.*, 2021; Gírio *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2020). Os resultados relatados com a inoculação e adubação nitrogenada foram: aumento na massa da parte aérea e da raiz, melhor eficiência no uso dos nutrientes, aumento em altura, perfilhamento, número de folhas, diâmetro do colmo, produção da matéria seca de colmos e de palha e no comprimento radicular.

É importante considerar o genótipo da cana-de-açúcar, pois é fator determinante para a associação com bactérias benéficas e para respostas a adubação nitrogenada (Carvalho *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2022; Lopes *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020). Adicionalmente, o tempo de produção de MPB é curto, o que torna necessário uma rápida associação entre as BPCV e as mudas, para que a promoção do crescimento vegetal seja mensurável.

Devido a ampla aplicação de *A. brasilense* em estudos de associação de bactérias com plantas e pela produção de inoculantes comerciais, esta espécie tem sido foco de diversas pesquisas. Estudos como o de Hungria *et al.* (2022) demonstraram que é possível reduzir a aplicação de nitrogênio em até 25% em culturas como o milho, sem comprometer o rendimento quando as sementes foram inoculadas com *A. brasilense*.

### 2.3 *Azospirillum brasilense*: IDENTIFICAÇÃO, MECANISMOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL E BENEFÍCIOS QUANDO ASSOCIADO COM GRAMÍNEAS

O gênero *Azospirillum* compreende bactérias de classificação alfa-proteobactérias, da família Azospiriláceas, gram-negativas, microaerófilas, não fermentativas, de vida livre e fixadoras de nitrogênio (LPSN, 2024; Tarrand; Krieg; Döbereiner, 1978). O grupo de proteobactérias originaram de ambiente marinhos. Wisniewski-Dyé *et al.* (2011) sugerem que o *Azospirillum* realizou a transição para ambientes terrestres há cerca de 400 milhões de anos, juntamente com a evolução do sistema radicular de plantas. Este gênero possui 36 espécies descritas até o segundo semestre de 2024 (LPSN, 2024), possui afinidade com 113 espécies e 35 famílias de plantas (Pereg; Bashan; Bashan, 2016) e foi isolado em 24 países e regiões no mundo (CGM, 2024).

Martinus Beijerinck no ano de 1925 na Holanda, descreveu o *A. lipoferum* (Beijerinck, 1925) após, Joana Döbereiner em 1978 no Brasil, publicou o estudo de

taxonomia e descrição do *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand; Krieg; Döbereiner, 1978). A espécie *A. brasilense* é considerada uma bactéria associativa (coloniza a superfície da raiz), com formato de bastonete, uniflagelada, com movimentos vibroides, apresenta diâmetro de 1 µm e comprimento de 2,1 a 3,8 µm (Tarrand; Krieg; Döbereiner, 1978).

A promoção do crescimento vegetal pelo *Azospirillum* ocorre pela ação de múltiplos mecanismos da bactéria em seu hospedeiro (Bashan; de-Bashan, 2010). O gênero é capaz de promover o crescimento vegetal de forma direta, disponibilizando/facilitando a aquisição de nutrientes pelo hospedeiro, como por exemplo, a FBN (Day; Döbereiner, 1976) e realizando a modulação hormonal por meio da síntese de fitormônios como auxina, giberilina e citocininas (Bottini *et al.*, 1989; Reynders; Vlassak, 1979; Tien *et al.*, 1979). De forma indireta, prevenindo/reduzindo os danos ou inibição do crescimento vegetal, por meio da indução de tolerância aos estresses abióticos e bióticos (Cassán; Diaz-Zorita 2016; Reed; Glick, 2023).

Inicialmente a FBN foi considerada a principal forma direta de promoção do crescimento vegetal pelo *Azospirillum* (Day; Döbereiner, 1976; Okon *et al.*, 1983). Com o avanço dos estudos, duas abordagens têm sido desenvolvidas para aumentar a eficiência da FBN, sendo elas: mutantes excretores de amônio, como é o caso da cepa HM053 e indução de paranódulos em plantas gramíneas (Cassán *et al.*, 2020).

Além da FBN, a absorção do ferro também é favorecida pela ação do mecanismo direto de promoção de crescimento vegetal de algumas BPCV. O Fe é um micronutriente muito importante para as plantas em vários processos fisiológicos, incluindo o processo de FBN, contudo, a sua absorção pelas plantas é baixa, devido a forma como o ferro está presente na solução do solo ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Em microrganismos o Fe também participa de processos fisiológicos, como a formação do biofilme. *A. brasilense* cepa HM053 possui a capacidade de secretar sideróforos (compostos orgânicos de alta afinidade por  $\text{Fe}^{3+}$ ) em condições de baixo teor de Fe no solo, principalmente os catecolatos, formando o complexo sideróforo- $\text{Fe}^{3+}$ . Esse complexo é reconhecido por receptores na superfície de microrganismos ou raízes de plantas, é absorvido e então reduzido para  $\text{Fe}^{2+}$ . Íons metálicos e cátions trivalentes também podem ser absorvidos pelos sideróforos (Ahmed; Holmström, 2014; Timofeeva *et al.*, 2023).

Cassán *et al.* (2014) e Cassán *et al.* (2020) descrevem as rotas metabólicas que o *Azospirillum* utiliza para produzir e liberar compostos indólicos (ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB), ácido fenilacético (AFA), ácido indol-3-láctico (AIL), triptamina). As duas principais vias metabólicas que estão relacionadas ao *A. brasilense* são vias dependentes de triptofano IPyA e TAM, sendo a via IPyA a mais importante para esse gênero (Cassán *et al.*, 2020; Rivera *et al.*, 2018). A produção de auxina é considerada muito

importante no processo de promoção de crescimento vegetal, pois um mutante de *A. brasilense* com o gene *ipdC* silenciado, mostrou possuir baixa capacidade de promoção do crescimento vegetal (Dobbelaere *et al.*, 1999).

A modulação de AIA na planta promove uma fitoestimulação do sistema radicular, mudando a sua configuração. Ocorre a redução do comprimento da raiz principal, aumento de raízes adventícias, laterais, pelos radiculares e por consequência aumentando o volume radicular, promovendo melhor absorção de nutrientes e água pela planta (Cassán *et al.*, 2020). Adicionalmente, estudos demonstraram que *A. brasilense* é capaz de produzir óxido nítrico (NO), o qual está relacionado com a sinalização do AIA, promovendo também a formação de raízes laterais e adventícias, possui papel importante na defesa da planta, sendo também utilizado no processo de interação planta-microrganismo (Cassán *et al.*, 2014; Khan *et al.*, 2023). Oliveira *et al.* (2023) descreveram que a cepa HM053 produziu os maiores níveis de NO 24 horas após inoculação no meio de cultivo FbHP–NH<sub>4</sub> Cl–lactato, em comparação com demais bactérias avaliadas.

Estudos conduzidos no Brasil por Joana Döberainer demonstraram grande afinidade do *Azospirillum* com plantas gramíneas (Day; Döbereiner, 1976; Von Bülow; Döbereiner, 1975). Até o presente momento, 49 anos depois dos primeiros estudos, a literatura continua comprovando a promoção do crescimento vegetal pelo *A. brasilense* em gramíneas como: *Digitaria decumbens* (Day; Döberainer, 1976), *Hordeum vulgare* (Santos *et al.*, 2017a), *Saccharum* spp. (Lopes *et al.*, 2019), *Setaria viridis* (Pankievick *et al.*, 2015), *Triticum aestivum* (Santos *et al.*, 2017b), *Oryza sativa* (Garcia *et al.*, 2016), *Urochloa brizanta* (Nakao *et al.*, 2018), *Zea mays* (Pedrosa *et al.*, 2019), *U. ruziziensis*, *Cynodon dactylon*, *Megathyrus maximus*, *Sorghum bicolor* (Santos *et al.*, 2021), entre outras.

Os trabalhos que testaram *A. brasilense* associado em gramíneas encontraram aumentos em massa seca parte aérea, massa seca da raiz, número de folhas e de colmos, diâmetro do colmo, aumento no volume radicular, aumento de produtividade, altura parte aérea, melhora no conteúdo nutricional, índice relativo de clorofila, brotação/germinação, entre outros (Gírio *et al.*, 2015; Housh *et al.*, 2021a; Lopes *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020; Pedrosa *et al.*, 2019).

### 2.3.1 *Azospirillum brasilense* cepa HM053

A bactéria *A. brasilense* cepa HM053 (Nif<sup>C</sup>, EDA<sup>R</sup>, NaI<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>) foi caracterizada como um mutante espontâneo da cepa FP2 (Sp7 ATCC 29145, Sm<sup>R</sup>, NaI<sup>R</sup>) (Machado *et al.*,

1991). Possui a capacidade de fixar nitrogênio ( $N_2$ ) mesmo na presença de alta concentração de amônio ( $NH_4^+$ ), por consequência excretando  $NH_4^+$  para o ambiente, devido à baixa atividade da enzima glutamina sintetase (GS) (Machado *et al.*, 1991).

O processo de FBN é a redução do  $N_2$  em  $NH_4^+$  pelo complexo da enzima nitrogenase, composta pelas proteínas dinitrogenase (MoFe) e dinitrogenase redutase (Fe) presente em bactérias diazotróficas (Fu *et al.*, 1989). Os genes *nif* (genes de fixação de nitrogênio), são regulados de forma transcricional, sendo o *nifA* regulado pelo  $NH_4^+$  e oxigênio (Araújo *et al.*, 2004; Arsene *et al.*, 1996; Fadel-Picheth *et al.*, 1999). A atividade da nitrogenase é regulada de forma trans-traducional, ou seja, implica que ocorra a ADP-ribosilação da dinitrogenase-redutase de forma reversível, ocasionando a inativação da enzima nitrogenase (Fu *et al.*, 1989). Este processo ocorre em altos níveis de amônio ou em depleção de energia. Quando o  $NH_4^+$  é consumido ou os níveis de energia são retomados, ocorre a remoção do grupo ADP-ribosil e permite novamente a ação da enzima nitrogenase (Huego *et al.*, 2012; Moure *et al.*, 2013).

As principais vias de assimilação intracelular do  $NH_4^+$  em glutamina e glutamato da bactéria *A. brasilense* é GS-GOGAT. A enzima GS é codificada pelo gene *glnA*, que promove a conversão de L-glutamato e amônio em L-glutamina, gastando ATP nesse processo. Após, a enzima GOGAT (glutamato sintetase) que é codificada pelos genes *gltD* e *gltB*, catalisa de forma dependente de NADPH, a L-glutamina em  $\alpha$ -cetoglutarato, resultando em duas moléculas de glutamato. Contudo, sob altas concentrações de  $NH_4^+$ , a enzima GS é inativada pela adenilação da enzima bifuncional adenililtransferase formada pelo gene *glnE* (Arcondéguy *et al.*, 2001; Elmerich; Aubert, 1971; Ghenov *et al.*, 2022; Meers; Tempest, 1970).

Ghenov *et al.* (2022) e Santos *et al.* (2017a) explicam que a enzima GS da cepa HM053 é deficiente na sua atividade. O gene *glnA* apresenta mutação pontual, ocasionando a mudança do aminoácido prolina para um resíduo de leucina na posição 347, ou seja, a mudança de uma base nitrogenada pirimidina citosina para uma timina na posição 1040. Portanto, essa mutação leva a redução drástica da ação da enzima GS e inibição da adenilação. Em condições de altos níveis de  $NH_4^+$ , a baixa atividade da enzima GS não reconhece o  $NH_4^+$  produzido pela nitrogenase, resultando em baixos níveis de L-glutamina intracelular, que sinaliza uma condição de baixo  $NH_4^+$  que afeta a cascata sensorial da FBN, mantendo a atividade da enzima nitrogenase. Assim o  $NH_4^+$  é excretado por meio de difusão da membrana celular. Em condição de baixo  $NH_4^+$  (condição de ocorrência da FBN) a enzima GS continua não assimilando o  $NH_4^+$  que é excretado.

A cepa HM053 quando inoculada em setária em cultivo *in vitro*, demonstrou fixar N<sub>2</sub> em quantias suficientes para a planta sobreviver e promover o seu crescimento, mantendo a demanda diária de nitrogênio da planta (Pankiewicz *et al.*, 2015). A cepa HM053 possui a capacidade de colonizar raízes de trigo em ambiente axênico avaliadas aos 3, 9 e 12 dias após inoculação, aumentando 30 a 49% do peso seco da parte aérea e da raiz respectivamente, em comparação com plantas não inoculadas. Ademais, a cepa também expressou 278 vezes a mais o gene *nifH* em relação a cepa FP2 quando inoculado na planta (Santos *et al.*, 2017b). Em plantas de cevada inoculadas com HM053 também ocorreu a expressão dos genes *nif* nas raízes e ocorreu aumentos no diâmetro do colmo, comprimento de raízes e peso radicular. Além da capacidade da cepa colonizar a superfície da raiz e a parte interna dos pelos radiculares (Santos *et al.*, 2017a). Pedrosa *et al.* (2019) cultivou a campo milho inoculado com a cepa associado com adubação nitrogenada, sendo encontrado aumento de produção de até 29%.

Scott *et al.* (2020) avaliaram sementes de milho cuja plantas foram cultivadas em vasos e inoculadas com HM053. As sementes apresentaram teor de ferro (Fe<sup>+2</sup>) quatro vezes maior e 13 nmol de ferritina (Fe<sup>+3</sup>) por peso seco, em comparação com plantas não inoculadas. Adicionalmente, o rendimento aumentou em 30 a 50%. Foram descritos também aumentos no Fe<sup>+2/+3</sup> em plantas de milho inoculadas com a cepa, demonstrando que a planta aumentou a alocação de carbono marcado (<sup>11</sup>C) para as raízes sendo transformadas em exsudados, como substratos ácidos, que auxiliam na quelação e transporte *in situ* do Fe quando assimilado. Destaca-se também, que a cepa HM053 exibiu maior nível de biossíntese de auxina quando comparado com outras cepas mutantes de *A. brasilense* (Housh *et al.*, 2021a).

Housh *et al.* (2021b) documentaram que quanto maior a produção de auxina, maior é a assimilação de Fe. Ao contrário ocorre com o zinco (<sup>65</sup>Zn) portanto, a cepa HM053 não é tão eficiente em promover a absorção deste micronutriente na planta. Aumentos na absorção de manganês radioativo (<sup>52</sup>Mn<sup>2+</sup>) em brotos de milho inoculados com HM053 também foram registrados, sendo maior distribuição de Mn na endoderme das raízes e concentração nas folhas estimulando a fotossíntese, promovendo aumento na concentração de clorofila (Housh *et al.*, 2022).

### 2.3.2 *Azospirillum brasilense* cepas Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7

As cepas Ab-V5 (CNPSo 2083), Ab-V6 (CNPSo 2084) e Ab-V7 foram isoladas de plantas de milho pelo grupo de pesquisa do Dr. Pedrosa no estado do Paraná pela Universidade Federal do Paraná - UFPR, sendo consideradas variantes naturais da cepa Sp7 (Hungria *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2020). Aumento de nutrientes exportados (P, K, Cu) nas folhas e grão de milho foram descritos, assim como, aumento de produção de 24-30% no milho inoculado e de 13-18% em trigo inoculado (Hungria *et al.*, 2010).

As cepas Ab-V5 e Ab-V6 são consideradas cepas elites devido aos benefícios comprovados em milho e trigo, tornando-se o primeiro inoculante comercial do Brasil em 2009. No ano de 2010 as cepas Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 atenderam aos requisitos da legislação brasileira de inoculantes em vigor, totalizando 11 inoculantes comerciais em 2016, ano que também foi lançado inoculante para pastagens (Hungria *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2020). Após 15 anos do primeiro inoculante, em 2024, o Brasil possui 219 inoculantes comerciais compostos por *A. brasilense*. Sendo registrados para as culturas milho, soja, trigo, arroz, arroz asiático, braquiária brizanta, feijão, grama do congo, brachiário e braquiária ruziziensis (CNPTIA, 2024; Paiva *et al.* 2024).

Em 2010 ocorreram estudos com as cepas associadas em cana-de-açúcar (Santos *et al.*, 2020). Estudos com as cepas Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 em 54 e 27 famílias de cana-de-açúcar cultivadas a campo, descreveram aumento de altura da planta e respostas diferentes dependendo do genótipo avaliado (Lopes *et al.*, 2012; Lopes *et al.*, 2019). A cultivar RB867515 inoculada com a cepa Ab-V5 também foi avaliada a campo, sendo observado aumento de rendimento, perfilhamento, produção de açúcar dependendo da dose utilizada (Scudeletti *et al.*, 2023). Ademais, existe algumas formulações de inoculantes comerciais com as cepas sendo recomendadas para uso na cultura da cana-de-açúcar no Brasil.

## REFERÊNCIAS

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, Feb. 2014. DOI. 10.1111/1751-7915.12117.

AMORIM, F. R.; PATINO, M. T. O.; BARTMEYER, P. M.; SANTOS, D. F. L. Productivity and profitability of the sugarcane production in the state of São Paulo, Brazil. **Sugar Tech**, v. 22, n. 4, p. 596–604, 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00813-2>.

ANPII. 2024. Análises e estatísticas 2023. Disponível em: <https://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

ARAÚJO, L. M.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; *et al.* GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 491–495, Jul. 2004. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.03.002>.

ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P. II Signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80–105, Mar. 2001. DOI. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.1.80-105.2001>.

ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by P(II) in *Azospirillum brasilense*: Evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830–4838, Ago.1996. DOI. <https://doi.org/10.1128/jb.178.16.4830-4838.1996>.

BASHAN Y., DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, Set. 2010. DOI. [https://doi.org/10.1016/s0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2113(10)08002-8).

BATISTA, L. G.; MELLO, V. H.; SOUZA, A. P.; MARGARIDO, G. R. A. Genomic prediction with allele dosage information in highly polyploid species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 135, n. 2, p. 723–739, Fev. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03994-w>.

BEIJERINCK M. W. Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoffbinden kann? **Zmtbl. Bakt. ParasitKde**, v. 11, n. 63, p. 353-359. 1925.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Environmental Microbiology**, v. 2641, p. 45–47, Mai. 1989. DOI. 10.1104/pp.90.1.45.

BRAGA JUNIOR, R. L. C.; LANDELL, M. G. A.; XAVIER, M. A.; KANTHACK, R. A. D.; SILVA, D. N.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, T. N.; SILVA, V. H. P.; RODRIGUES, P. E.; CARREGARI, H. R.; ANJOS, I. A. **Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2022/23**. Instituto agrônômico, 2023.

CARVALHO, T. L. G. de; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 31–41, Fev. 2011. DOI. 10.1007/s12042-011-9069-2.

CARVALHO, T. L. G.; ROSMAN, A. C.; GRATIVOL, C.; *et al.* Sugarcane genotypes with contrasting biological nitrogen fixation efficiencies differentially modulate nitrogen metabolism, auxin signaling, and microorganism perception pathways. **Plants**, v. 11, n. 15, p. 1-31, Jul. 2022. DOI. 10.3390/plants11151971.

CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. , p. 461-479, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, Dec. 2016. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440–459, Ago. 2014. DOI. 10.1007/s00344-013-9362-4.

CIPRIANO, M. A. P.; FREITAS-IÓRIO, R. DE P.; DIMITROV, M. R.; *et al.* Plant-growth endophytic bacteria improve nutrient use efficiency and modulate foliar n-metabolites in sugarcane seedling. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 1–19, Fev. 2021. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030479>.

CNPTIA. Inoculantes, 2024. Disponível em: <https://www.atermaisdigital.cnptia.embrapa.br/web/inoculantes?q=Azospirillum+brasiliense>. Acesso em: 22 nov. 2024.

CGM. *Azospirillum*, 2024. Disponível em: <https://gcm.wdcm.org/search?search=azospirillum>. Acesso em: 22 nov. 2024.

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, n. 2, p. 97–103, Out. 2008. DOI. 10.1007/s10725-007-9232-9.

CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2023/2024 - 4º levantamento*. v. 11, p. 1–52, Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/cana>. Acesso em: 22 nov. 2024.

DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A.; ZAMBOM, J. L. C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BRASILEIRO, B. P.; WEBER, H.; IDO, O. T.; RUARO, L. *et al.* 2020. Programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar: Relatório técnico 2012-2020.

DAY, J. M.; DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from Digitaria roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 45–50, Jun. 1976. DOI. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90020-1).

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, n. 2, p. 155–164, Mai. 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1004658000815>. Acesso em: 22 nov. 2024.

DOS SANTOS, S. G.; CHAVES, V. A.; RIBEIRO, F. S.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12–23, 2019. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.015>.

DUTTA, S.; PODILE, A. R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 232–244, Ago. 2010. DOI. 10.3109/10408411003766806.

- ELMERICH C., AUBERT J. P. Synthesis of glutamate by a glutamine: 2-oxo-glutarate amidotransferase (NADP oxidoreductase) in *Bacillus megaterium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 42, n. 3, p. 371–376, Dec. 1971.
- FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; *et al.* Regulation of *Azospirillum brasilense* nifA gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281–288, Oct. 1999. DOI. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08739.x>.
- FAOSTAT. Production - Crops and livestock products, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 13 nov. 2024.
- FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; FARONI, C. E.; *et al.* Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29–41, Feb. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.11.011>.
- FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; *et al.* Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 9, p. 4679–4685, Set. 1989. DOI. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4679-4685.1989>.
- GAVA, G. J. de C.; SCARPARE, F. V.; CANTARELLA, H.; *et al.* Nitrogen source contribution in sugarcane-inoculated plants with diazotrophic bacteria under urea-N fertigation management. **SugarTech**, v. 21, n. 3, p. 462–470, Abr. 2019. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0614-2>.
- GARCIA, N. F. S.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; *et al.* Doses and application methods of *Azospirillum brasilense* in irrigated upland rice. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 990–995, nov. 2016. DOI. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n11p990-995>.
- GHENOV, F.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; *et al.* Characterization of glutamine synthetase from the ammonium-excreting strain HM053 of *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1–8, Jul. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.235927>.
- GÍRIO, L. A. DA S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; *et al.* Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization effect on the initial growth of sugarcane from pre-sprouted seedlings. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 33–43, Jan. 2015. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100004>.
- GÍRIO, L. A. S. da; DA SILVA, R. P.; DE MENEZES, P. C.; *et al.* Quality of multi-row harvesting in sugarcane plantations established from pre-sprouted seedlings and billets. **Industrial Crops and Products**, v. 142, Dec. 2019. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111831>.
- GLOBALFERT. Outlook GlobalFert 2024. 2024. Disponível em: <https://globalfert.com.br/outlook-globalfert/>. Acesso em: 24. Nov. 2024.
- GONÇALVES, M. C.; SILVA, K. C. DA; OLIVEIRA, C. E. DA S.; STEINER, F. Nitrogênio e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar. **Colloquium Agrariae**, v. 16, n. 2, p. 72–81, Mar. 2020. DOI. [10.5747/ca.2020.v16.n2.a360](https://doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n2.a360).

- HOUSH, A. B.; BENOIT, M.; WILDER, S. L.; *et al.* Plant-growth-promoting bacteria can impact zinc uptake in *Zea mays*: An examination of the mechanisms of action using functional mutants of *Azospirillum brasilense*. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, Mai. 2021b. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051002>.
- HOUSH, A. B.; POWELL, G.; SCOTT, S.; *et al.* Functional mutants of *Azospirillum brasilense* elicit beneficial physiological and metabolic responses in *Zea mays* contributing to increased host iron assimilation. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 15, n. 5, p. 1505–1522, Jan. 2021a. DOI. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00866-x>.
- HOUSH, A. B.; WALLER, S.; SOPKO, S.; *et al.* *Azospirillum brasilense* bacteria promotes Mn<sup>2+</sup> uptake in maize with benefits to leaf photosynthesis. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, Jun. 2022. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071290>.
- HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; MULLER-SANTOS, M.; *et al.* PII signal transduction proteins: Pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, Jan. 2012. DOI. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049783-0>.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, Jan. 2010. DOI. [10.1007/s11104-009-0262-0](https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0).
- HUNGRIA, M.; BARBOSA, J. Z.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 114, n. 5, p. 2969–2980, Jun. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1002/agj2.21150>.
- JAOUDE, R. ABOU; LUZIATELLI, F.; FICCA, A. G.; RUZZI, M. A plant's perception of growth-promoting bacteria and their metabolites. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, n. Jan., p. 1–31, 2023. DOI. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1332864>.
- KHAN, E. A.; AFTAB, S.; HASANUZZAMAN, M. Unraveling the importance of nitric oxide in plant-microbe interaction. **Plant Stress**, v. 10, p. 1-9. 2023. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100258>.
- LANDELL, M. G. DE A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A. dos. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agrônomo, n. 109, 2012.
- LOPES, V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DE ARAUJO, L. M.; *et al.* The selection of sugarcane families that display better associations with plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 43–52, Jul. 2012. DOI. [10.3923/ja.2012.43.52](https://doi.org/10.3923/ja.2012.43.52).
- LOPES, V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; FIGUEIREDO, G. G. O.; OLIVEIRA, R. A. de; DAROS, E. Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 527–538, Abr. 2019. DOI. [10.5433/1679-0359.2019v40n2p527](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n2p527).

LPSN. Genus: *Azospirillum*, 2024. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/azospirillum>. Acesso em: 22 nov. 2024.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549–553, Jul. 1991. DOI. <https://doi.org/10.1139/m91-092>.

MARIN, F. R. Cana, 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pre-producao/caracteristicas/solo>>. Acesso em: 22 nov. 2024.

MATOSO, E. S.; REIS, V. M.; GIACOMINI, S. J.; *et al.* Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. **Scientia Agricola**, v. 78. n. 1, p. 1–9, Jul. 2021. DOI. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0035>.

MAY, A.; RAMOS, N. P. **Uso de gemas individualizadas de cana-de-açúcar para a produção de mudas**. Circular Técnica 29, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2019.

MAY, A.; SANTOS, M. DE S. DOS; SILVA, E. H. F. M. DA; *et al.* Effect of *Bacillus aryabhatai* on the initial establishment of pre-sprouted seedlings of sugarcane varieties. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1-9, 2021. DOI. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12337>.

MEDEIROS, C.; ALMEIDA BALSALOBRE, T. W.; CARNEIRO, M. S. Molecular diversity and genetic structure of *Saccharum* complex accessions. **PLOS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1–17, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233211>.

MEERS, J. L.; TEMPEST, D. W. Glutamine(amide) : 2-Oxoglutarate Amino Transferase Oxido-reductase (NADP) ', an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. **Journal of General Microbiology**, v, 64, p. 187-194, Dec. 1970. DOI. <https://doi.org/10.1099/00221287-64-2-187>.

MIRANDA, L. L. D.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. Cana-de-açúcar, Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 882p. 2008.

MOURA, J. B. A.; SOUZA, R. F.; VENTURA, M. V. A.; FURQUIM, L. C.; JUNIOR, W. G. V. Influence of nitrogen fixing bacteria in the establishment of pre-broken sugar cane. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 22–26, Jan. 2019. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/332819512\\_INFLUENCE\\_OF\\_NITROGEN\\_FIXING\\_BACTERIA\\_IN\\_THE\\_ESTABLISHMENT\\_OF\\_PRE-BROKEN\\_SUGAR\\_CANE](https://www.researchgate.net/publication/332819512_INFLUENCE_OF_NITROGEN_FIXING_BACTERIA_IN_THE_ESTABLISHMENT_OF_PRE-BROKEN_SUGAR_CANE). Acesso em: 22 nov. 2024.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z. Y.; *et al.* The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase adpribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein glnB. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, Jan. 2013. DOI. <https://doi.org/10.1128/jb.01517-12>.

NAKAO, A. H.; ANDREOTTI, M.; SOARES, D. de A.; MODESTO, V. C.; DICKMANN, L. Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for

silage. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, n. 3, p. 501–511, Set. 2018. DOI. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180057>.

OLIVEIRA, M. S.; SANTOS, K. F. D. N.; DE PAULA, R. M.; *et al.* Nitric oxide detection using a chemical trap method for applications in bacterial systems. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, Ago. 2023. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092210>.

OKON, Y.; HEYTLER, P. G.; HARDY, R. W. F. N<sub>2</sub> Fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 694–697, Set. 1983. DOI. 10.1128/aem.46.3.694-697.1983.

OLIVEIRA, R. A.; BARBOSA, G. V. S.; DAROS, E. 50 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 30 anos de RIDESA, 2021. Curitiba: RIDESA.

OTTO, R.; MACHADO, B. A.; MELO DA SILVA, A. C.; QUASSI DE CASTRO, S. G.; LISBOA, I. P. Sugarcane pre-sprouted seedlings: A novel method for sugarcane establishment. **Field Crops Research**, v. 275, Jan. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108336>.

OTTO, R.; CASTRO, S. A. Q.; MARIANO, E.; *et al.* Nitrogen use efficiency for sugarcane-biofuel production: What is next? **Bioenergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1272–1289, jun. 2016. DOI. 10.1007/s12155-016-9763-x.

PAIVA, C. A. O.; GOMES, E. A.; SOUZA, S. M.; LANA, U. G. P.; SILVA, F. C.; FREIRE, F. J. Microrganismos promotores de crescimento vegetal em cana-de-açúcar e outras gramíneas. *In*: SILVA, F. C.; FREIRE, F. J. **Inovação e desenvolvimento em cana-de-açúcar Manejo, nutrição, bioinsumos, recomendação de corretivos e fertilizantes**. Brasília: Embrapa, 2024. p. 161-181.

PANKIEVICZ, V. C. S.; do AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; *et al.* Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907–919, Mar. 2015. DOI. <https://doi.org/10.1111/tpj.12777>.

PEDROSA, F. O.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARÃES, V. F.; *et al.* The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, Jun. 2019. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>.

PEREG, L.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v. 399, p. 389–414, Dec. 2016. DOI. 10.1007/s11104-015-2778-9.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; *et al.* Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–1150, Mar. 2007. DOI. 10.1007/s00253-007-0909-9.

PEREIRA, W.; OLIVEIRA, R. P.; PEREIRA, A.; *et al.* Nitrogen acquisition and 15N-fertiliser recovery efficiency of sugarcane cultivar RB92579 inoculated with five diazotrophs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, n. 1, p. 37–50, Nov. 2021. DOI. <https://doi.org/10.1007/s10705-020-10100-x>.

- REED, L.; GLICK, B. R. The recent use of plant-growth-promoting bacteria to promote the growth of agricultural food crops. **Agriculture (Switzerland)**, v. 13, n. 5, p. 1–24, Mai. 2023. DOI. <https://doi.org/10.3390/agriculture13051089>.
- REIS, G. V.; SIEBENEICHLER, S. C.; LAZZARETTI, B.; *et al.* Growth response of pre-sprouted seedlings of sugarcane in the presence of the bacterium *Herbarspirillum frisingense*. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 1387–1391, Out. 2019. DOI. <https://dx.doi.org/10.22161/ijeab.45.15>.
- REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 11, n. 5, p. 547–548, Feb. 1979.
- RIVERA, D.; MORA, V.; LOPEZ, G.; *et al.* New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1774–1785, Ago. 2018. DOI. [10.1111/jam.14080](https://doi.org/10.1111/jam.14080).
- ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; *et al.* Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1–9, Abr. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019045>.
- ROSSETTO, L.; PIERANGELI, G. M. F.; KURAMAE, E. E.; *et al.* Sugarcane pre-sprouted seedlings produced with beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. **Bragantia**, v. 80, Dec. 2021. DOI. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200276>.
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 45, p. 1–31, Nov. 2021. DOI. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcS20200128>.
- SANTOS, S. G. dos; DA SILVA RIBEIRO, F.; ALVES, G. C.; SANTOS, L. A.; REIS, V. M. Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1–2, p. 25–44, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04101-1>.
- SANTOS, A. R. S.; ETTO, R. M.; FURMAM, R. W.; *et al.* Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422–426, Set. 2017a. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.003>.
- SANTOS, K. F. D. N.; MOURE, V. R.; HAUER, V.; *et al.* Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1–2, p. 245–255, Dec. 2017b. DOI. [10.1007/s11104-016-3140-6](https://doi.org/10.1007/s11104-016-3140-6).
- SCHULTZ, N., REIS, V. M., URQUIAGA, S. **Resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada: fontes nitrogenadas, formas de aplicação, épocas de aplicação e efeito varietal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2015.
- SCOTT, S.; HOUSH, A.; POWELL, G.; *et al.* Crop yield, ferritin and Fe ( II ) boosted by

*Azospirillum brasilense* (HM053) in corn. **Agronomy**, v. 10, n. 3, p. 394, Mar. 2020. DOI. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030394>.

SCUDELETTI, D.; CRUSCIOL, C. A. C.; MOMESSO, L.; *et al.* Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential. **European Journal of Agronomy**, v. 144, Mar. 2023. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126749>.

SILVA, F. C.; LUCHIARI JÚNIOR, A.; FREITAS, P. L.; PEREIRA, W.; COLETI, J. T.; RODRIGUES, G. C.; CARVALHO, M. L.; CHISTOFOLETI, D. Produção, plantio e condução de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. *In*: SILVA, F. C.; FREIRE, F. J. **Inovação e desenvolvimento em cana-de-açúcar Manejo, nutrição, bioinsumos, recomendação de corretivos e fertilizantes**. Brasília: Embrapa, 2024. p. 161-181.

SOUZA, F. G. de; ALVAREZ, R. DE C. F.; TEODORO, L. P. R.; *et al.* Planting arrangement and seedling type influence yield and quality of ratoon sugarcane? **Sugar Tech**, v. 24, n. 5, p. 1590–1596, Fev. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-01086-z>.

SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419, Dec. 2015. DOI. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.

SPIRONELLO, A.; RAIJ, B.; PENATTI, C. P.; CANTARELLA, H.; MORELLI, J. L. M.; ORLANDO FILHO, J.; LANDELL, M. G. A.; ROSSETTO, R. Sugarcane crop. *In*: VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**, 2<sup>nd</sup> ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 1997.

STOLF, R.; LEE, T.S. G. Sistema comercial de plantio de plântulas de cultura de tecidos ou de gemas isoladas: plantio de estaca. **Alcool e Açúcar**, v.10, n.53, p.20-5, Jun. 1990.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBERAINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1976, Abr. 1978.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, Mai. 1979. DOI. [10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979](https://doi.org/10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979).

TIMOFEEVA, A. M.; GALYAMOVA, M. R.; SEDYKH, S. E. Plant growth-promoting soil bacteria: Nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. **Plants**, v. 12, n. 24, Dec. 2023. DOI. <https://doi.org/10.3390/plants12244074>.

TOMKINS, J. P.; YU, Y.; MILLER-SMITH, H.; *et al.* A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 3–4, p. 419–424, Ago. 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s001220051252>. Acesso em: 22 nov. 2024.

UNICA. Setor sucroenergético – açúcar, 2024a. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/acucar/>. Acesso em: 13 nov. 2024.

UNICA. Setor sucroenergético – outros produtos, 2024b. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/outros-produtos/>. Acesso em: 13 nov. 2024.

UNICA. Unicadata – fotografia do setor, 2024c. Disponível em: <https://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=158>. Acessado em: 13 nov. 2024.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; DE MORAIS, R. F.; *et al.* Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, Out. 2012. DOI. 10.1007/s11104-011-1016-3.

VON BÜLOW, J. F. W.; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. **Agricultural Sciences**, v. 72, n. 6, p. 2389-2393, Jun. 1975. DOI. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2389>.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; *et al.* *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 12, Dec. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>.

### 3 CAPÍTULO I GROWTH AND NUTRITIONAL CONTENT OF PRE-SPROUTED SEEDLINGS OF FIVE SUGARCANE CULTIVARS INOCULATED WITH *Azospirillum brasilense* Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7, AND HM053 STRAINS

### CRESCIMENTO E CONTEÚDO NUTRICIONAL DE MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CINCO CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* CEPAS Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 E HM053

#### ABSTRACT

The use of pre-sprouted seedlings (PSS) of sugarcane offers benefits such a reduction the number of stalks during planting and improvements in seedling health. The genus *Azospirillum* is recognized for its benefits when associated with grasses. The objective of this study was to evaluate the effects of inoculation with *A. brasilense* strains Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7 (Triazo) or HM053 on the growth and nutritional content of five sugarcane cultivars grown in PSS system. Cultivars RB867515, RB006970, RB966928, RB056351, and RB016916 were inoculated with Triazo or strain HM053. The experiment was conducted using a completely randomized design in a factorial scheme. The percentage of sprouting and roots were evaluated at 7 days after inoculation (DAI). The remaining biometric and nutritional assessments occurred at 50 DAI. Inoculation with *A. brasilense* (Triazo or HM053) resulted in an increase in shoot dry matter in cultivar RB006970 and inoculation with HM053 in RB056351. The highest percentage of sprouting was in RB867515 and RB966928 inoculated with Triazo. Triazo reduced root and fine root length in RB056351 at 7 DAI. Interaction between cultivar and inoculant was observed with RB867515 showing a positive effect with Triazo, RB056351 benefited from inoculation with the strain HM053 and RB016916 did not show a positive effect with the bacterial strains. The genotypes responded differently to the strain used, demonstrating that there is a specific genotype-strain interaction. In general, the Triazo inoculant demonstrated better performance compared to HM053.

**Keywords:** *Saccharum* spp. Plant growth-promoting bacteria. Mini-setts. PGPB. PSS.

#### RESUMO

A utilização de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar oferece benefícios como redução do número de colmos durante o plantio e melhoria na sanidade das mudas. O gênero *Azospirillum* é reconhecido pelos seus benefícios quando associado a gramíneas. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da inoculação com as cepas Ab-V5, Ab-V6 e Ab-V7 (Triazo) ou HM053 de *A. brasilense* no crescimento e conteúdo nutricional de cinco cultivares de cana-de-açúcar cultivadas em sistema MPB. As cultivares RB867515, RB006970, RB966928, RB056351 e RB016916 foram inoculadas com Triazo ou com a cepa HM053. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial. A porcentagem de brotação e raízes foram avaliadas aos 7 dias após a inoculação (DAI). As demais avaliações biométricas e nutricionais ocorreram aos 50 DAI. A inoculação com *A. brasilense* (Triazo ou HM053) resultou em aumento na massa seca da parte aérea na cultivar RB006970 e a inoculação com HM053 na RB056351. A maior porcentagem de brotação foi observado nas cultivares RB867515 e RB966928 inoculadas com Triazo. Triazo reduziu o comprimento da raiz e da raiz fina em RB056351 aos 7 DAI.

Foi observada interação entre cultivar e inoculante com RB867515 apresentando efeito positivo com Triazo, RB056351 se beneficiou da inoculação com a cepa HM053 e RB016916 não apresentou efeito positivo com as cepas bacterianas. As cultivares responderam de forma diferente à cepa utilizada, demonstrando que existe uma interação genótipo-cepa específica. De modo geral, o inoculante Triazo demonstrou melhor desempenho em relação ao HM053. **Palavras-chave:** *Saccharum* spp. Bactérias promotoras de crescimento de plantas. Mini-toletes. BPCV. MPB.

### 3.1 INTRODUCTION

Sugarcane (*Saccharum* spp.) is a crop of great economic and social importance, utilized for the production of sugar, ethanol and other products (Formann et al. 2020). It is considered the primary feedstock for sugar and one of the most important for ethanol production (FAOSTAT 2024). Brazil stands as the world's main producer of sugarcane (FAOSTAT 2024), achieving an average yield of 85,580 kg ha<sup>-1</sup> from 8,333 thousand hectares of planted area during the 2023/24 harvest (CONAB 2024). Furthermore, sugarcane plays a pivotal role in fostering technological advancement and employment (UNICA 2024).

An alternative to the traditional method of planting sugarcane from cane setts is the pre-sprouted seedlings (PSS) system (Landell et al. 2012; Otto et al. 2022), which consists of producing seedlings from mini-setts. The use of MPB reduces the number of stalks used in planting new sugarcane fields. Conventional planting uses around 20 T ha<sup>-1</sup> of stalk while the PSS system requires only 2 T ha<sup>-1</sup> of stalk. This represents a significant reduction that facilitates the logistics of planting and transporting plants to the field, providing vigorous plants with more stalk available for sugar and ethanol production, as well as making it possible to promote disease control in seedlings (Landell et al. 2012; Otto et al. 2022). Additionally, inoculation of plant growth-promoting bacteria (PGPB) in PSS system has demonstrated advantages, such as increased biometric values in sugarcane (Gírio et al. 2015; dos Santos et al. 2019b; Matoso et al. 2021). Inoculation with the genus *Azospirillum* in sugarcane in the field and in the initial phase of plant development, has been shown to increase in growth variables (Lopes et al. 2012; Lopes et al. 2019; Moura et al. 2019).

Brazil stands out in studies with the genus *Azospirillum*, with the species *A. brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 being a commercial inoculant in Brazil since 2009 (Santos et al. 2019a; Paiva et al. 2025). In 2020, 9 commercial inoculants formulated with *A. brasilense* were available for maize, wheat and rice cultivation, of which 6 are formulated with the Ab-V5 and Ab-V6 strains (Paiva et al. 2025). These strains, when inoculated into grasses such as maize, wheat, barley, and sugarcane, have shown biometric increases in plants

(Hungria et al. 2010; Martin et al. 2024; Scudeletti et al. 2023). As reported by Hungria et al. (2010), the Ab-V5, Ab-V6, and Ab-V7 strains, promoted increased productivity and higher nutritional content in maize leaves when inoculated. Lopes et al. (2019) observed an increase in height in inoculated plants, when used the inoculant with strains Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7 (Triazo) in 27 sugarcane families in the field.

The bacterium *A. brasilense* strain HM053 is a spontaneous mutant of *A. brasilense* strain FP2. This mutant is able to excrete ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) and fix nitrogen ( $\text{N}_2$ ) even in the presence of high  $\text{NH}_4^+$  concentrations, a capability enabled by a mutation in the glutamine synthetase protein (Machado et al. 1991; Santos et al. 2017a). There is evidence of growth promotion in barley, wheat, maize and setaria plants inoculated with HM053 strain. In maize inoculated with HM053, production increased by up to 29%, and there is a greater uptake of  $\text{Fe}^{2+/3+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  as well as the induction of high auxin levels in the host. In setaria inoculated with HM053, a significant amount of  $\text{N}_2$  was uptake via biological fixation. Similarly, in barley and wheat, inoculation with strain HM053 resulted in biometric increases in plants (Pankiewicz et al. 2015; Santos et al. 2017a; Santos et al. 2017b; Pedrosa et al. 2019; Scott et al. 2020; Housh et al. 2021; Housh et al. 2022).

The interaction between bacterial strain and the plant is influenced by multiple factors, with the plant genotype being a determining factor for this association (de Carvalho et al. 2011; Lopes et al. 2012; Pereg et al. 2016; Figueiredo et al. 2017; Lopes et al. 2019). One must consider that sugarcane has a very complex genotype, a condition that leads to varied responses to inoculation (Tonmkins et al. 1999). Therefore, it is important to understand which strain is most efficient for each genotype in order to achieve more significant benefits. Furthermore, as the cultivation time for pre-sprouted seedlings is short, it is essential to use efficient PBCVs and highly responsive genotypes.

It should be noted the increasing use of inoculants in crops and the use of sugarcane cultivation in a PSS system; factors that bring sustainability, resource savings and profitability to sugarcane production. According to ANPII (ANPII, 2024), in 2023 the use of inoculants formulated with *Azospirillum* in Brazil represented 26% of doses, as well as the use of inoculants in sugarcane was 2%, demonstrating growth in the use of inoculants in culture. In 2020, 14 commercial inoculants based on *Azospirillum* were commercially available. In 2019, approximately 10.5 million inoculant doses of *A. brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 for grasses were sold in Brazil (Santos et al. 2021). In view previously, studies are needed to understand the association of different sugarcane genotypes, cultivated in a PSS system, and the bacteria *A. brasilense* strains Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 (Triazo) and HM053. The objective

of this study was: to evaluate the effects of inoculation with strains Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7 of *A. brasilense* (Triazo inoculant) or HM053 on the growth and nutritional content of five sugarcane cultivars grown in PSS system.

## 3.2 MATERIALS AND METHODS

### 3.2.1 *Azospirillum brasilense* strains

*Azospirillum brasilense* strains Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7 were isolated from maize plants (Hungria et al. 2010). The strain HM053 (Nif<sup>C</sup>, EDA<sup>R</sup>, Nal<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>) was characterized as a spontaneous mutant of the FP2 strain (Sp7 ATCC 29145, Sm<sup>R</sup>, Nal<sup>R</sup>) (Machado et al. 1991). Each strain of *A. brasilense* was cultivated separately in liquid culture medium NFbHPN-lactate (Machado et al. 1991), with antibiotics streptomycin (80 µg mL<sup>-1</sup>) and nalidixic acid (10 µg mL<sup>-1</sup>). Bacterial cells were grown for 48 hours under agitation at 120 rpm at 30 °C.

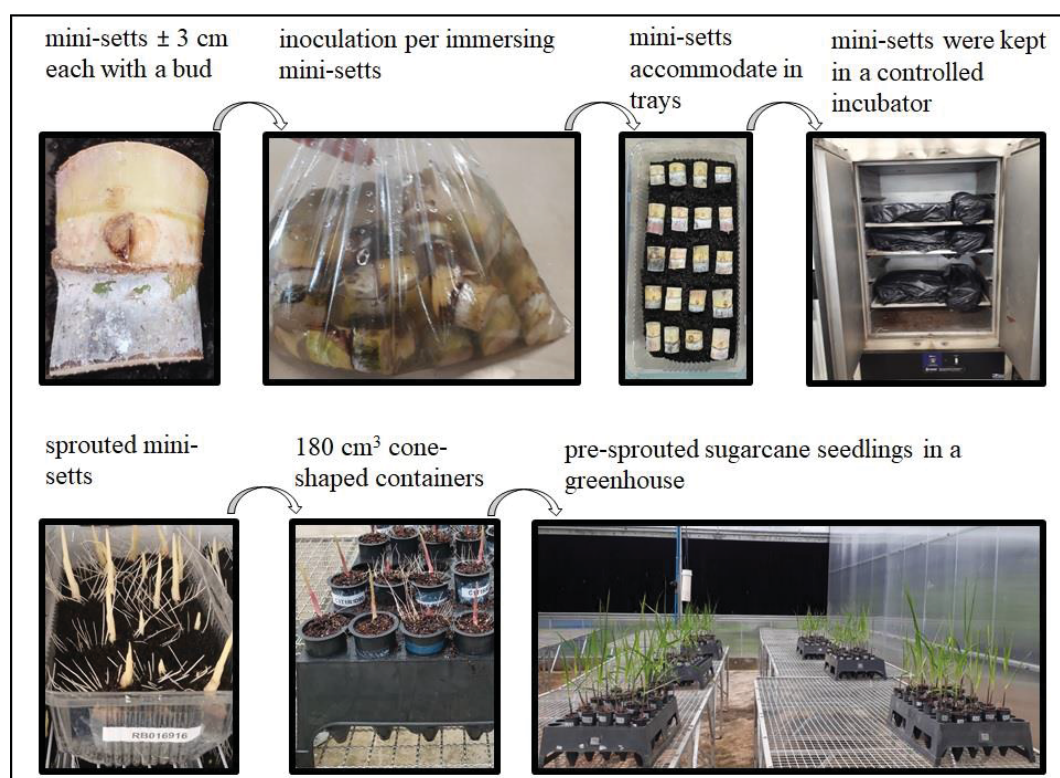
Strains Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 and HM053 were grown separately to a concentration of ~10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup>. *A. brasilense* Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7 were formulated into the liquid inoculant Triazo, which had the same bacterial concentration (1:1:1 v/v) for each of the strains. Strain HM053 was used as a second liquid inoculant. The inoculants were diluted in deionized water to 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup> for each inoculant.

### 3.2.2 Sugarcane cultivars, inoculation conditions and growth in PSS system

The bacterial inoculants (Triazo and HM053) were tested on the following sugarcane cultivars: RB867515, RB006970, RB966928, RB056351, and RB016916. The cultivars were obtained from Sugarcane Genetic Improvement Program of the Federal University of Paraná and the Interuniversity Network for the Development of the Sugar and Alcohol Sector (PMGCA/UFPR/RIDESA). The cultivars were selected based on the genetic diversity of the plant material and according to the following criteria: new cultivars on the market (RB056351, RB006970), cultivar under development (RB016916), and the most widely cultivated cultivars RB in Brazil, RB867515 and RB966928 (Braga Junior et al. 2023).

The inoculation procedure consisted of immersing mini-setts (± 3 cm each with one bud), in the inoculants (Triazo or HM053) for 30 minutes (Matoso et al. 2021). The mini-setts that received the control treatment (without bacterial inoculation) were immersed in sterilized NFbHP culture medium for 30 minutes. Subsequently, the mini-setts were accommodated in

trays (30 x 14 x 9.5 cm) containing the commercial substrate Maxfétil® (composition: pine bark, natural phosphate, carbonized rice husk, vermiculite and chemical fertilizer NPK, pH: 6), each tray accommodating 20 mini-sets of a cultivar submitted to a treatment. The mini-sets were kept in a controlled incubator with air circulation at 30 °C in the dark for 7 days until sprouting began. Afterward, the sprouted mini-sets were transplanted into 180 cm<sup>3</sup> cone-shaped containers containing the commercial substrate Carolina Soil® (composition: peat, vermiculite, roasted rice husks, limestone, pH: 5.5). They were then placed in a greenhouse with automatic temperature and humidity control (30 °C and 70% humidity) in the Agricultural Sciences Sector at the Federal University of Paraná in the city of Curitiba/PR, Brazil (Fig. 3-1).



**Fig. 3-1** Representation of the experiment conducted with pre-sprouted sugarcane seedlings inoculated with *Azospirillum brasilense*

In October, November, and December 2021, the experiment was conducted using a completely randomized design in a factorial scheme (5 x 3), evaluating 5 cultivars, 2 inoculants (inoculant Triazo, inoculant HM053), and a control (without bacterial inoculation). Two replicates per treatment were implemented with each plot consisting of 5 plants. Evaluations were performed individually for each plant. The treatments encompassed combinations of the factors, resulting in a total of 15 treatments.

### 3.2.3 Growth and nutritional variables of sugarcane seedlings grown the plants in a PSS system

The evaluation of sprouting percentage (SP) was carried out at 7 DAI considering the total number of buds sprouted, with 10 plants evaluated per plot with two replicates. At 50 DAI, the following variables biometric were evaluated: the height of the aerial part of the plant (HEIGHT), measured from the base of the stalk to dewlap of the leaf +1, and the diameter at the base of the stalk (SD), measured with a digital caliper, number of leaves (NL), considering only fully expanded green leaves.

For the destructive analyses on 7 DAI and 50 DAI, the sugarcane sprouts and seedlings were removed from the trays and cone-shaped containers and washed under running water using sieves (2 mm mesh) to remove all the substrate without damaging the root system. Root dry matter (RDM) at 7 DAI and at 50 DAI and shoot dry matter (SDM) at 50 DAI were dried in an oven with air circulation at 52 °C until reaching a constant matter after was weighed on an analytical balance.

The roots of sugarcane sprouts at 7 DAI and of seedlings at 50 DAI were analyzed using WinRHIZO™ software (Regent Instruments, 2013), coupled with an image scanner as described by dos Santos et al. (2019b). Root length (RL), root surface area (RSA), root volume (RV) and root length by diameter class were considered. Root length was classified as follows: very thin root length (VTR) (< 0.5 mm) and thin root length (TR) (> 0.5 to < 1.5 mm).

Nutritional analyzes were carried out at the Plant Nutrition Laboratory at UFPR, Curitiba. The samples (aerial part of the plants) were initially crushed. To obtain the nitrogen (N) content, the samples were weighed (0.1 g) and subjected to the micro-Kjeldahl method (Tedesco et al. 1995). For the nutrients such as content phosphorus (P), potassium (K), magnesium (Mg), calcium (Ca), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn) and zinc (Zn), the samples were analyzed using an optical emission spectrometer with inductively coupled argon plasma (ICP-OES, model: Varian 720-ES). The crushed samples (0.5 g) were placed in porcelain crucibles and subjected to acid digestion (Martins and Reissmann 2007). The experimental conditions used for the ICP-OES were: radio frequency power: 1.20 kW, plasma flow: 15 L min<sup>-1</sup>, nebulizer pressure: 200 kPa and auxiliary gas (argon): 1.5 L min<sup>-1</sup>. The correlation coefficient for the nutrient calibration curves was 0.99. After the nutrient content values were obtained, the amount of nutrient extraction by the plant was calculated. This

evaluation was carried out using the formula (content of each nutrient of the shoot plant x dry matter of the shoot plant/1000).

### 3.2.4 Statistical analyses

The data were subjected to the Bartlett test to verify the homogeneity of variances. After performing the analysis of variance (ANOVA), the means were compared using the Tukey test. For all significance tests, a significance level ( $\alpha$ ) of 5% was used. All analyses and figures were performed with R software (R Development Core Team, 2023).

## 3.3 RESULTS

The variables that showed a significant interaction between cultivars and inoculants were: SP, SDM (Table 3-1), TR at 7 DAI (Table 3-2), K content (Table 3-3), and the extraction of Ca, Mg, Mn by plants (Table 3-4). The inoculant factor was significant for the variables: HEIGHT, NL (Table 3-1), RL, VTR (Table 3-2) and Fe and Mn content (Table 3-3). Root evaluations at 50 DAI using WinRHIZO™ software, SD, Cu content, and the extraction of nutrients N, P, K, Cu, Fe, Zn by plants showed no significant difference.

**Table 3-1.** Summary of analysis of variance and mean squares of growth variables of sugarcane plants grown in PSS system, inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053.

SV	DF	SP (%)	HEIGHT (cm)	NL (un)	SDM (g)	<sup>1</sup> RDM (g)	<sup>2</sup> RDM (g)
Cultivars (C)	4	0.07*	8.17*	0.3 <sup>ns</sup>	0.64*	0.008*	0.01*
Inoculants (I)	2	0.01 <sup>ns</sup>	2.32*	0.4*	0.27*	0.0004 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>
C X I	8	0.01*	0.70 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.49*	0.0007 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>
Residue	15	0.004	0.56	0.1	0.06	0.0002	0.10
Overall average		73	16.8	3.9	1.9	0.1	0.7
CV (%)		6.4	4.4	7.7	12.9	15.2	11.6

SV – sources of variation, CV – coefficient of variation, DF – degrees of freedom, SP – sprouting percentage, HEIGHT – shoot height, SDM – shoot dry matter, <sup>1</sup>RDM – root dry matter evaluated at 7 DAI, <sup>2</sup>RDM – root dry matter evaluated at 50 DAI. ns Not significant. \* Significant at 5% probability.

**Table 3-2.** Summary of analysis of variance and mean squares of variables evaluated in roots of sugarcane sprouts, inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053.

SV	DF	RL (cm)	RSA (cm <sup>2</sup> )	RV (cm <sup>3</sup> )	VTR (cm)	TR (cm)
Cultivars (C)	4	48519.0*	1454.3*	0.39*	28140.2*	7568.8*
Inoculants (I)	2	25389.0*	236.6 <sup>ns</sup>	0.005 <sup>ns</sup>	17228.2*	657.8 <sup>ns</sup>
C X I	8	8274.0 <sup>ns</sup>	180.7 <sup>ns</sup>	0.03 <sup>ns</sup>	3905.0 <sup>ns</sup>	846.0*
Residue	15	3891.0	84.0	0.02	2206.3	319.2
Overall average		459.0	70.8	0.9	279.9	169.9
CV (%)		13.6	13	14.4	16.8	10.5

Evaluated at 7 DAI with WinRHIZO™ software. SV – sources of variation, CV – coefficient of variation, DF – degrees of freedom, RL – root length, RSA – root surface area, RV – root volume, VTR – very thin root length (<0.05 mm), TR – thin root length (> 0.5 to < 1.5 mm). ns not significant. \* Significant at 5% probability.

**Table 3-3.** Summary of analysis of variance and mean squares of nutrient content aerial part of sugarcane plants grown in PSS system, inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053.

SV	DF	N (g kg <sup>-1</sup> )	P (g kg <sup>-1</sup> )	K (g kg <sup>-1</sup> )	Ca (g kg <sup>-1</sup> )	Mg (g kg <sup>-1</sup> )	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	Zn (mg kg <sup>-1</sup> )
Cultivars (C)	4	8.1*	1.1*	4.3*	0.2*	0.3*	2285.4*	1611.3*	36.0*
Inoculants (I)	2	5.5 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.4 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	0.3 <sup>ns</sup>	3827.3*	541.7*	18.7 <sup>ns</sup>
C X I	8	5.0 <sup>ns</sup>	0.2 <sup>ns</sup>	2.0*	0.01 <sup>ns</sup>	0.006 <sup>ns</sup>	155.9 <sup>ns</sup>	142.2 <sup>ns</sup>	4.1 <sup>ns</sup>
Residue	15	2.2	0.2	0.7	0.04	0.01	391.6	86.4	5.0
Overall average		14.0	4.8	18.4	2.2	2.5	101.6	141.1	16.1
CV (%)		9.9	9.2	4.5	8.6	4.4	19.5	6.6	13.9

SV – sources of variation, CV – coefficient of variation, DF – degrees of freedom, N – nitrogen, P – phosphorus, K – potassium, Ca – calcium, Mg – magnesium, Fe – iron, Mn – manganese, Zn – zinc. ns not significant. \* Significant at 5% probability.

**Table 3-4.** Summary of analysis of variance and mean squares of extraction of nutrients by plants grown in PSS system and inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053.

SV	DF	Ca (g plant <sup>-1</sup> )	Mg (g plant <sup>-1</sup> )	Mn (mg plant <sup>-1</sup> )
Cultivars (C)	4	0.0000005 <sup>ns</sup>	0.000002*	0.006 <sup>ns</sup>
Inoculants (I)	2	0.0000007 <sup>ns</sup>	0.0000002 <sup>ns</sup>	0.003 <sup>ns</sup>
C X I	8	0.000001*	0.000002*	0.007*
Residue	15	0.0000005	0.0000005	0.002
Overall average		0.004	0.005	0.3
CV (%)		16.3	14.7	17.8

Analysis carried out aerial part of sugarcane seedlings. SV – sources of variation, CV – coefficient of variation, DF – degrees of freedom, Ca – calcium, Mg – magnesium, Mn – manganese. ns not significant. \* Significant at 5% probability.

For the inoculant factor, regardless of cultivar, plants inoculated with strain HM053 showed reduced HEIGHT and NL (Table 3-5) in relation to plants inoculated with Triazo, but did not differ from control plants. When evaluating the roots at 7 DAI using WinRHIZO™ software, inoculation with Triazo resulted in a lower RL (Table 3-5) when compared to control plants, and did not differ from plants inoculated with strain HM053. Inoculation with strain HM053 reduced the Fe and Mn content in the aerial parts of the plants by 31% and 9%,

respectively, compared to the control plants (Table 3-5). Plants inoculated with Triazo had lower Fe content (21%) than control plants.

**Table 3-5.** Mean values of significant biometric and nutrient content in aerial part of sugarcane seedlings grown in a PSS system for the inoculant (Triazo and HM053) factor.

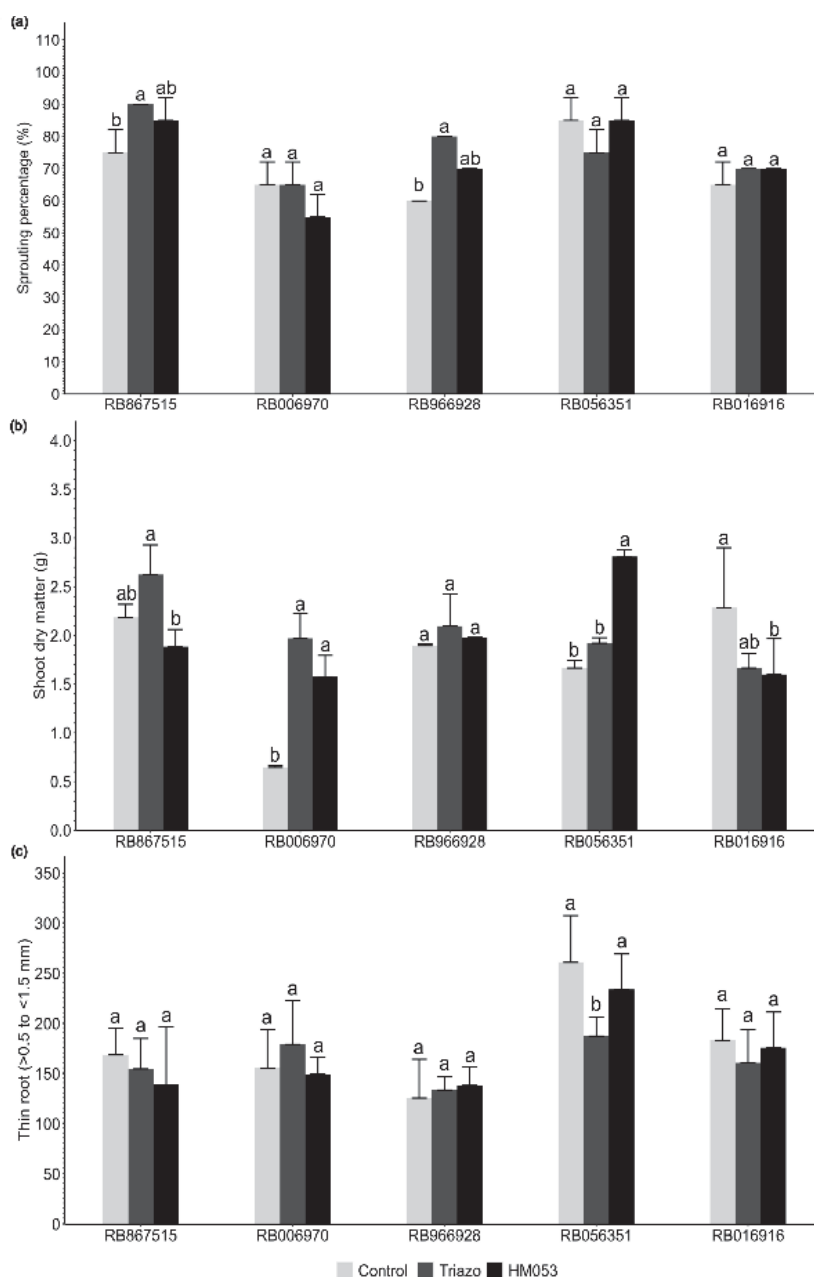
	HEIGHT (cm)	NL (un)	RL (cm)	VTR (cm)	Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	Mn (mg kg <sup>-1</sup> )
Control	16.7ab	4.0ab	513.1a	323.7a	123.2a	149.3a
Triazo	17.3a	4.1a	413.4b	241.2b	96.6b	138.8ab
HM053	16.4b	3.7b	450.7ab	274.6ab	85.0b	135.1b

HEIGHT – shoot height, NL – number of leaves, RL - root length evaluated at 7 DAI, VTR – Very thin root evaluated at 7 DAI, Fe – iron content, Mn – Manganese content.

Means followed by equal letters in the columns do not differ according to Tukey's test at 5% significance.

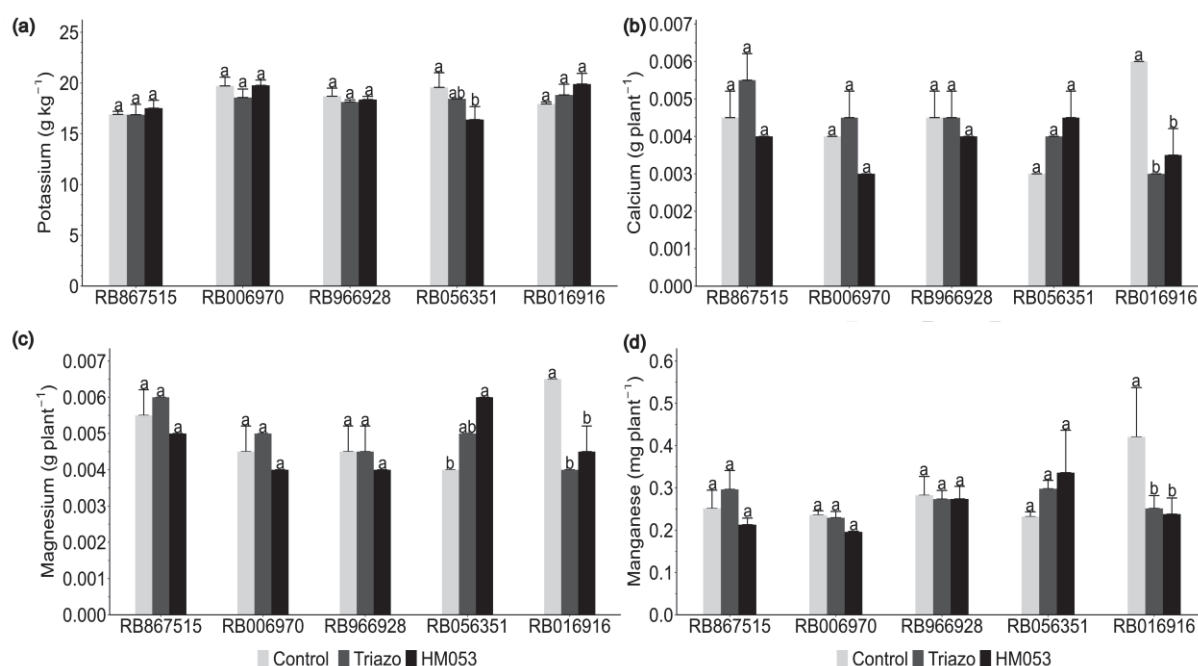
Inoculation with Triazo led to better SP in cultivars RB867515 and RB966928, with increase of 20% and 33%, correspondingly, compared to control plants (Fig. 3-2a). Regarding SDM (Fig. 3-2b), cultivar RB006970 demonstrated an increase of 203% and 143% when inoculated with Triazo and HM053, in that order, compared to the control plants. Cultivar RB056351 showed a positive interaction with strain HM053, with 15% and 68% more SDM, compared to plants inoculated with Triazo and control plants, respectively. Cultivars RB867515 and RB016916 had lower or equal SDM when inoculated with strain HM053 compared to control plants and plants inoculated with Triazo, respectively.

Evaluation of root growth using WinRHIZO™ software at 7 DAI showed that, for TR length (Fig. 3-2c) cultivar RB056351 had 28% less thin roots compared to control plants and 10% less compared to plants inoculated with HM053.



**Fig. 3-2** Biometric variables of sugarcane seedlings inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053. Interaction between cultivar and inoculant factors. (a) sprouting percentage. (b) shoot dry matter. (c) thin root length (> 0.5 to < 1.5 mm). Sprouting percentage and thin roots length were evaluated at 7 DAI. Shoot dry matter variable was evaluated at 50 DAI. Columns represent the mean value and bars represent the standard deviation. The columns followed by equal letters compare inside each cultivar do not differ according to Tukey's test at 5% significance

When evaluating the nutrient content, cultivar RB056351 showed lower K content in the aerial part when inoculated with strain HM053 (Fig. 3-3a). The other cultivars did not exhibit any significant changes. Plants (RB016916) inoculated with Triazo or HM053, extracted less Ca, Mg and Mn than control plants (Fig. 3-3b, c, d). Regarding Mg extraction (Fig. 3-3c), cultivar RB056351 inoculated with HM053 extracted more than control plants.



**Fig. 3-3** Nutritional variables of sugarcane seedlings inoculated with *A. brasilense*: Triazo and HM053. Interaction between cultivar and inoculant factors. (a) content Potassium. (b) Calcium extraction. (c) Magnesium extraction. (d) Manganese extraction. Variables were evaluated at 50 DAI in the aerial part of seedlings sugarcane. Columns represent the mean value and bars represent the standard deviation. The columns followed by equal letters compare inside each cultivar do not differ according to Tukey's test at 5% significance

### 3.4 DISCUSSION

The PSS system allows a reduction in the quantity of stalks needed for planting making it essential to obtain pre-sprouted sugarcane seedlings with good development and good health (Landell et al. 2012). PGPB inoculation can be beneficial when inoculated at the early stage of shoot development, leading to increased profitability and sustainability for the sugar-energy sector. Some bacterial species were evaluated in sugarcane PSS system such as: *A. brasilense*, *Bacillus aryabhatai*, *B. caribensis*, *Pseudomonas* sp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Nitrospirillum amazonense*, *Paraburkholderia tropica*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* and *H. frisingens* (Girio et al. 2015; Moura et al. 2019; Reis et al. 2019; dos Santos et al. 2019b; Gonçalves et al. 2020; Matoso et al. 2021; May et al. 2021; Rossetto et al. 2021). The works cited previously reported increased stalk diameter, root dry matter, volume and area especially of the fine roots, sprouting speed index, height shoot, root length and nitrogen accumulation.

The results of the present study demonstrated that the genotype of the plant must be considered in association with PGPB, since the cultivars in this work exhibited different nutritional and biometric responses when inoculated. Sugarcane is known to have one of the

most complex and extensive genomes (~3000 Mbp) (Tomkins et al. 1999), a factor that favors different responses to inoculation with PGPB. Studies involving the association of sugarcane families and cultivars with the inoculation of *A. brasilense* and other PGPB yielded divergent responses depending on the genotype evaluated, thus, corroborating with the literature (Moutia et al. 2010; Lopes et al. 2012; Figueiredo et al. 2017; Lopes et al. 2019; Reis et al. 2019; dos Santos et al. 2019b; Lira et al. 2020; Matoso et al. 2021). Optimizing the use of bacterial strains and responsive genotypes can favor the production of sugarcane seedlings and boost sustainable cultivation.

Significant increases in growth (SP, SDM) in sugarcane seedlings inoculated with *A. brasilense* (Fig. 3-2a, b), can be attributed to the ability of the genus *Azospirillum* to induce plant growth regulators such as auxin, gibberellin and cytokinin (Cassán and Diaz-Zorita 2016; Cassán et al. 2020). The hypothesis of the action of multiple mechanisms to achieve a positive effect on the plant is accepted (Cassán et al. 2020). Considering that the initial budding phase is supported by nutritional reserves of mini-setts (Marafon 2012), the increase in sprouting percentage was probably due to hormonal modulation. This effect is comparable to biopriming, a technique that involves hydrating seeds with PGPB to promote plant growth (Mahmood et al. 2016). Cultivars RB867515 and RB966928, when inoculated with Triazo, showed an increase in the percentage of sprouting. Ferreira et al. (2020) also observed positive effects on mini-setts of cultivar sugarcane RB867515 sprouting when immersed in an inoculant with the bacteria *Rhizobium* sp. It is noteworthy that this positive interaction with Triazo occurred between the most planted cultivars (RB867515, RB966928), these two cultivars have genetic characteristics for good/very good sprouting capacity and fast growth speed in the field (Oliveira et al. 2021).

Another positive response of cultivar RB867515 when inoculated with Triazo was the increase in shoot dry matter. Scudeletti et al. (2023) also used the Ab-V5 and Ab-V6 strains in the RB867515 cultivar in the field and observed an increase in the number of stalks, demonstrating a positive effect of this cultivar with the strains both in the field and in the PSS system. Furthermore, studies with sugarcane inoculated with Ab-V5, Ab-V6 and Ab-V7 strains of *A. brasilense* showed positive responses in plant growth variables such as stalk diameter and height, both in the initial period development and in the field (Lopes et al. 2012; Lopes et al. 2019; Moura et al. 2019).

Seedlings of cultivars RB006970 and RB056351 (recently released cultivars) when inoculated with HM053 or Triazo and only with HM053, respectively, showed increases in shoot dry matter. Plants of cultivar RB056351 showed the best interaction with strain HM053.

Wheat plants inoculated with strain HM053 also showed an increase in shoot dry matter (Santos et al. 2017b). However, plants of the developing cultivar RB016916 and cultivar RB867515, inoculated with strain HM053, resulted in a reduction in shoot dry matter, resulting in a negative interaction. Once again, the data reinforce the importance of the strain-genotype interaction.

In this study, the Triazo inoculant reduced root length in all cultivars and reduced thin root length at 7 DAI in cultivar RB056351 (Table 3-4 and Fig. 3-2c). As expected, the reduction in root length is attributed to the effect of *A. brasilense*, as auxin induction causes root length to decrease while promoting the growth of lateral roots, and root hairs (Cassán et al. 2020). However, at 7 DAI there was a decrease in the length of the characteristic fine root which was expected to increase. However, it was observed that at 50 DAI inoculation with Triazo and strain HM053 did not alter the root system compared to control plants. Therefore, it appears that it was a temporary change, not harming the root system when Triazo was inoculated. Santos et al. (2017) observed increases in root length and matter in barley plants inoculated with strain HM053. Viana et al. (2020) cultivated sugarcane plants (cultivar RB867515) for 90 days in a greenhouse and observed an increase in root dry matter when the plants were inoculated with the Ab-V5 and Ab-V6 strains.

The strains Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7, and HM053 of *A. brasilense* have the ability to fix nitrogen (Machado et al. 1991; Hungria et al. 2010; Pankievicz et al. 2015). However, the quantification of N in the aerial part of sugarcane plants inoculated and grown in a PSS system, assessed at 50 DAI was not significant. dos Santos et al. (2019b) also did not observe significant increases at 50 days in sugarcane seedlings, possibly the short evaluation time favors this negative result, as the plant has its nutritional reserves. Plants of cultivars RB867515, RB006970 and RB966928 did not develop changes nutritional with bacterial inoculation. Sugarcane plants cultivar RB016916 inoculated with Triazo and HM053 exported lower contents of Ca, Mg and Mn (Fig. 3-3b-d). These results corroborate a decrease in shoot dry matter when inoculated with HM053 and no significant positive effect between the bacteria and this genotype (Fig. 3-2).

Potassium is the element most absorbed by sugarcane (Korndorfer et al. 2018). It is used by the plant to transport phytoassimilates through the phloem (Deeken et al. 2002), among other biological functions. The K content in the shoot was lower in cultivar RB056351 when inoculated with HM053. This reduction may be a dilution effect, as plants of this same cultivar had a higher dry matter when inoculated with HM053 (Fig. 3-2c; 3a). At the same time, these plants also extracted higher levels of Ca, Mg and Mn (Fig. 3-3b-d), however only

Mg extraction showed a significant difference. The amount of nutrient absorption and extraction may vary depending on the sugarcane genotype (de Oliveira et al. 2010). As the RB056351 cultivar was recently released, there are still no studies determining its nutrient extraction and absorption capacity. Therefore, these results may be associated with the promotion of growth and nutrient demand of the bacteria. Although the root system was not significantly altered, a biochemical alteration of the plant induced by the bacteria occurred.

Inoculation of sugarcane with Triazo and HM053 resulted in a reduction in the Fe and Mn content, regardless of the cultivars (Table 3-5). Galindo et al. (2016) inoculated field-grown maize with the Ab-V5 and Ab-V6 strains of *A. brasilense* and also observed a reduction in the Fe content in the leaves. These results were contrast with those observed when HM053 was inoculated into maize. Scott et al. (2020) observed an increase in Fe<sup>2+</sup> in maize seeds grown in pots. Housh et al. (2021) and Housh et al. (2022) described a significant increase in Fe<sup>2+/3+</sup> and Mn<sup>2+</sup> content in maize in an aeroponic and hydroponic system inoculated with strain HM053. Most likely, what occurred in this work with the quantification of Fe and Mn in the aerial part of sugarcane seedlings could be a dilution effect of these nutrients.

Beneficial effects were observed between the two inoculants used and the sugarcane cultivars. However, when comparing the Triazo inoculant and the HM053 strain in sugarcane seedlings at 50 DAI, the plants inoculated with Triazo showed better results. For instance, in term of aerial part height, NL (Table 3-5) and SP (Fig. 3-2a). The association between PGPB and plants depends on various factors such as plant genotype, bacterial strain, environmental conditions, phenological stage, and dose and/or concentration of the inoculum (de Carvalho et al. 2011; Schultz et al. 2017; Scudeletti et al. 2023), important factors to take into consideration when choosing the inoculant. Although *A. brasilense* is among the most studied beneficial bacteria, there is a noticeable lack of studies that clearly demonstrate the relationship between *A. brasilense* and the different sugarcane cultivars under different cultivation methods.

## CONCLUSIONS

Inoculation of sugarcane PSS with *A. brasilense* strains Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 and HM053 demonstrated positive effects during the initial period of seedling development. The best results were observed in plants inoculated with Triazo compared to those inoculated with strain HM053. The cultivars showed varied responses to inoculation, with cultivar RB867515

having the best interaction with the Triazo inoculant and cultivar RB056351 being more positively responsive to inoculation with strain HM053. Cultivar RB016916 did not show a positive effect with the bacteria used. The results demonstrate the importance of strain-genotype interaction. Therefore, it is necessary to consider the genotype and strain for recommendations in agricultural use and also for studies focused on sugarcane with PGPB inoculation.

## REFERENCES

ANPII. 2024. Análises e estatísticas 2023. Accessed 24 July 2024. <https://www.anpii.org.br/estatisticas/>.

Braga Junior, R.L.C., M.G.A. Landell, M.A. Xavier, R.A.D. Kanthack, D.N. Silva, M.A.P. Bidóia, T.N. Silva, V.H.P Silva, P.E. Rodrigues, H.R. Carregari, and I.A. Anjos. 2023. Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2022/23. *Instituto agrônomo* 235: 63.

Cassán, F., A. Coniglio, G. López, R. Molina, S. Nieves, C.L.N Carlan, F. Donadio, et al. 2020. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils* 56: 461-479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

Cassán, F., and M. Diaz-Zorita. 2016. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry* 103: 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

CONAB. 2024. Acompanhamento safra brasileira de cana-de-açúcar – Safra 2023/24. *Brasília* 11 (4): 1–52.

de Carvalho, T.L.G, P.C.G. Ferreira, and A. S. Hemerly. 2011. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. *Tropical Plant Biology* 4: 31-41. <https://doi.org/10.1007/s12042-011-9069-2>.

de Oliveira, E.C.A., F.J. Freire, R.I. Oliveira, M.B.G.S. Freire, D.E. Simões Neto, and S.A.M. Silva. 2010. Nutrient extraction and export by fully irrigated sugarcane varieties. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo* 34 (4): 1343–1352. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832010000400031>.

Deeken, R., D. Geiger, J. Fromm, O. Koroleva, P. Ache, R. Langenfeld-Heyser, N. Sauer, S.T. May, and R. Hedrich. 2002. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. *Planta* 216: 334-344. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0895-1>.

dos Santos, S.G., V.A. Chaves, F.S. Ribeiro, G.C. Alves, and V.M. Reis. 2019b. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. *Applied Soil Ecology* 133: 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.015>.

- FAOSTAT. 2024. Production - crops and livestock products. Accessed 24 July 2024. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>.
- Ferreira, N.S., G.F. Matos, C.H.S.G. Meneses, V.M. Reis, J.R.C. Rouws, S. Schwab, J.I. Baldani, and L.F.M. Rouws. 2020. Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and their effect on plant development. *Plant and Soil* 451: 221-238. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04388-0>.
- Figueiredo, G.G.O., C.C. Joño, T. Romano, J.C. Bernal Filho, and E. Daros. 2017. Sugarcane clones inoculated with five species of promoting growth plant bacteria. *Idesia* 35 (2): 71-77. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292017005000021>.
- Formann, S., A. Hahn, L. Janke, W. Stinner, H. Sträuber, W. Logroño, and M. Nikolausz. 2020. Beyond sugar and ethanol production: Value generation opportunities through sugarcane residues. *Frontiers in Energy Research* 8:579577. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.579577>.
- Galindo, F.S., M.C.M. Teixeira Filho, S. Buzetti, J.M.K. Santini, C.J. Alves, L.M. Nogueira, M.G.Z. Ludkiewicz, M. Andreotti, and J.L.M. Bellotte. 2016. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo* 40: e0150364. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20150364>.
- Gírio, L.A. Silva, F.L.F. Dias, V.M. Reis, S. Urquiaga, N. Schultz, D. Bolonhezi, and M.A. Mutton. 2015. Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization effect on the initial growth of sugarcane from pre-sprouted seedlings. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 50 (1): 33-43. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2015000100004>.
- Gonçalves, M.C., K.C. Silva, C.E.S. Oliveira, and F. Steiner. 2020. Nitrogênio e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar. *Colloquium Agrariae* 16 (2): 72-81. <https://doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n2.a360>.
- Housh, A.B., G. Powell, S. Scott, A. Anstaett, A. Gerheart, M. Benoit, S. Waller, et al. 2021. Functional mutants of *Azospirillum brasilense* elicit beneficial physiological and metabolic responses in *Zea mays* contributing to increased host iron assimilation. *ISME Journal* 15 (5): 1505-1522. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00866-x>.
- Housh, A.B., S. Waller, S. Sopko, A. Powell, M. Benoit, S.L. Wilder, J. Guthrie, M.J. Schueller, and R.A. Ferrieri. 2022. *Azospirillum brasilense* bacteria promotes Mn<sup>2+</sup> uptake in maize with benefits to leaf photosynthesis. *Microorganisms* 10 (7): 1290. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071290>.
- Hungria, M., R.J. Campo, E.M. Souza, and F.O. Pedrosa. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil* 331: 413-425. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.
- Korndorfer, G.H., H.S. Pereira, I.N. Duarte, L.R.N. Pinto, and L.F. Fonseca. 2018. Sugarcane cultivation with source potassium low water-soluble. *Acta Scientiarum* 40 (1): e36399. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.36399>.

- Landell, M.G.A., M.P. Campana, P. Figueiredo, M.A. Xavier, I.A. Anjos, L.L. Dinardo-Miranda, M.S. Scarpari et al. 2012. *Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas*. Campinas: Instituto Agrônômico 109: 16.
- Lira, D.N.S., A.M.S. Arauco, C.L. Boechat, M.R. Moitinho, J.J.J. Lacerda, and E.C. Martins. 2020. Associative diazotrophic bacteria inoculated in sugarcane cultivars: Implications on morphophysiological attributes and plant nutrition. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo* 44:e0190155. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcS20190155>.
- Lopes, V.R., J.C. Bespalhok Filho, G.G.O. Figueiredo, R.A. Oliveira, and E. Daros. 2019. Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. *Semina: Ciências Agrárias* 40 (2): 527-538. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n2p527>.
- Lopes, V.R., J.C. Bespalhok Filho, L.M. Araujo, F.V. Rodrigues, E. Daros, and R.A. Oliveira. 2012. The selection of sugarcane families that display better associations with plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Agronomy* 11: 43-52. <https://doi.org/10.3923/ja.2012.43.52>.
- Machado, H.B., S. Funayama, L.U. Rigo, and F.O. Pedrosa. 1991. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. *Canadian Journal of Microbiology* 37 (7): 549-553. <https://doi.org/10.1139/m91-092>.
- Mahmood, A., O.C. Turgay, M. Farooq, and R. Hayat. 2016. Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: A review. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (8):fiw112. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>.
- Marafon, A.C. 2012. *Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: Uma introdução ao procedimento prático*. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros 168: 29.
- Martin, T.N., M. G.M Fipke, T.M. Müller, J. Cechin, Faé, G.S Faé and G.A Arismendi. 2024. *Azospirillum brasilense*: Inoculation and nitrogen management on the development and yield of barley. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 55 (8): 1148-1158. <https://doi.org/10.1080/00103624.2023.2296541>
- Martins, A.P.L., and C.B. Reissmann. 2007. Laboratory routine for chemical and analytical procedures on plant tissues. *Scientia Agraria* 8 (1): 1-17.
- Matoso, E.S., V.M. Reis, S.J. Giacomini, M. Teixeira, A.R. Avancini, and S. Delmar. 2021. Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. *Scientia Agricola* 6 (2): 7261-7274. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0035>.
- May, A., M.S. Santos, E.H.F.M. Silva, R.S. Viana, N.A. Vieira Junior, N.P. Ramos, and I.S. Melo. 2021. Effect of *Bacillus aryabhattai* on the initial establishment of pre-sprouted seedlings of sugarcane varieties. *Research, Society and Development* 10 (2). <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12337>.

Moura, J.B., R.F. Souza, M.V.A. Ventura, L.C. Furquim, W.G. Vieira Junior, A.P.M. Braga, I.R. Lima et al. 2019. Influence of nitrogen fixing bacteria in the establishment of pre-broken sugar cane. *Asian Journal of Microbiology Biotechnology and Environmental Sciences* 21 (1): 22–26.

Moutia, J.F.Y., S. Saumtally, S. Spaepen, and J. Vanderleyden. 2010. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. *Plant and Soil* 337: 233-242. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0519-7>.

Oliveira, R.A., G.V.S. Barbosa, and E. Daros. 2021. *50 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 30 anos de RIDESA*. Curitiba: RIDESA.

Otto, R., B.A. Machado, A.C.M. Silva, S.G.Q. Castro, and I.P. Lisboa. 2022. Sugarcane pre-sprouted seedlings: A novel method for sugarcane establishment. *Field Crops Research* 275:108336. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108336>.

Paiva, C.A.O., E.A. Gomes, S.M. Souza, U.G.P. Lana, F.C. Silva, F.J. Freire. Microrganismos promotores de crescimento vegetal em cana-de-açúcar e outras gramíneas. In: Silva, F.C., F.J. Freire. *Inovação e desenvolvimento em cana-de-açúcar Manejo, nutrição, bioinsumos, recomendação de corretivos e fertilizantes*. Brasília: Embrapa, 2024. p. 161-181.

Pankievicz, V.C.S., F.P. Amaral, K.F.D.N. Santos, B. Agtuca, Y. Xu, M.J. Schueller, A.C.M. Arisi, et al. 2015. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *Plant Journal* 81: 907-919. <https://doi.org/10.1111/tpj.12777>.

Pedrosa, F.O., A.L.M. Oliveira, V.F. Guimarães, R.M. Etto, E.M. Souza, F.G. Furmam, D.R.P. Gonçalves, et al. 2019. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. *Plant and Soil* 451: 45-56l. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>.

Pereg, L., L.E. De-Bashan, and Y. Bashan. 2016. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. *Plant and Soil* 399: 389-414. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9>.

R Development Core Team. 2023. Accessed 24 July 2024. <https://www.r-project.org/>.

Reis, G.V., S.C. Siebeneichler, B. Lazzaretti, A. S. Sousa, M.A. Resplandes, R.B. Marques, Á.P. Sousa, M.F. Rocha, L.P. Rosa, and M. Oliveira. 2019. Growth response of pre-sprouted seedlings of sugarcane in the presence of the bacterium *Herbaspirillum frisingense*. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology* 4 (5): 1387-1391. <https://doi.org/10.22161/ijeab.45.15>.

Rossetto, L., G.M.F. Pierangeli, E.E. Kuramae, M.A. Xavier, M.A.P. Cipriano, and A.P.D. Silveira. 2021. Sugarcane pre-sprouted seedlings produced with beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Bragantia* 80: e2721. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200276>.

Santos, A.R.S., R.M. Etto, R.W. Furmam, D.L. Freitas, K.F. D.E.N. Santos, E.M. Souza, F.O. Pedrosa, R.A. Ayub, M.B.R. Steffens, and C.W. Galvão. 2017a. Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. *Plant*

*Physiology and Biochemistry* 118: 422-426. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.003>.

Santos, K.F.D.N., V.R. Moure, V. Hauer, A.R.S. Santos, L. Donatti, C.W. Galvão, F.O. Pedrosa, E.M. Souza, R. Wassem, and M.B.R Steffens. 2017b. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. *Plant and Soil* 415: 245-255. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3140-6>.

Santos, M.S., M.A. Nogueira, and M. Hungria. 2019a. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. *AMB Express* 9: 205. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.

Santos, M.S., M.A. Nogueira, and M. Hungria. 2021. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. *Revista Brasileira De Ciência Do Solo* 45: e0200128. <https://doi.org/10.36783/18069657RBCS20200128>.

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

Scott, S., A. Housh, G. Powell, A. Anstaett, A. Gerheart, M. Benoit, S. Wilder, M. Schueller, and R. Ferrieri. 2020. Crop yield, ferritin and Fe (II) boosted by *Azospirillum brasilense* (HM053) in corn. *Agronomy* 10 (3): 394. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030394>.

Scudeletti, D., C.A.C. Crusciol, L. Momesso, J.W. Bossolani, L.G. Moretti, E.F. Oliveira, B.S. Tubaña, M.A. Silva, S.G. Castro, M. Hungria. 2023. Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential. *European Journal of Agronomy* 144: 126749. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126749>.

Tedesco, M.J., C. Gianello, C.A. Bissani, H. Bohnen, and S.J. Volkweiss. 1995. *Análise de solo, planta e outros materiais*. Porto Alegre: Departamento de solos 5:174.

Tomkins, J.P., Y. Yu, H. Miller-Smith, D.A. Frisch, S.S. Woo, and R.A. Wing. 1999. A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 419-424. <https://doi.org/10.1007/s001220051252>.

Unica. 2024. Labor conditions. Accessed 24 July 2024. <https://www.sugarcane.org/sustainability-the-brazilian-experience/labor-conditions/>.

Viana, R.S., B.R.A. Moreira, L.A.M. Lisboa, R. Sandu Junior, T.A.R. Nogueira, P.A.M. Figueiredo, M.C.M. Teixeira Filho, and S.B. Ramos. 2020. Morphological changes in sugarcane crop induced by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Sugar Tech* 22 (2): 241-249. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00773-2>.

WinRhizoTron. 2013. Accessed 24 July 2024. <http://www.regentstruments.com/products/rhizo/RHIZOTorn.html>.

## 4 CAPÍTULO II MUDAS PRÉ-BROTADAS DE CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADAS COM *Azospirillum brasilense* HM053 E ADUBADAS COM NITROGÊNIO

### RESUMO

*Antecedentes e objetivos* O uso de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (MPB) inoculadas com bactérias diazotróficas pode proporcionar mudas com melhor desempenho a campo. Nesse sentido, a adubação nitrogenada também potencializa o desenvolvimento vegetal. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da bactéria *Azospirillum brasilense* HM053 com ou sem adubação nitrogenada em MPB de cana-de-açúcar da cultivar RB867515, analisando variáveis de crescimento e nutricionais das plantas.

*Métodos* A cultivar RB867515 de cana-de-açúcar foi inoculada com HM053 combinada com as doses de adubação nitrogenada: 0, 30, 60, 200 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato, além do controle (sem HM053 e sem adubação nitrogenada). As plantas foram cultivadas em sistema de MPB no delineamento inteiramente casualizado contendo 6 repetições com 5 plantas por parcela. As mensurações das variáveis de crescimento e nutricionais ocorreram 50 dias após a inoculação.

*Resultados* A inoculação com HM053 independente da dose de adubação utilizada em MPB, proporcionou aumento significativo em diâmetro do colmo, número de folhas e volume da raiz. Ocorreu aumentos nutricionais (teor de P e K) em plantas inoculadas e adubadas. Contudo os teores de Fe e Cu na parte aérea das mudas e o conteúdo desses micronutrientes reduziram quando as mudas foram inoculadas com HM053 independente da dose de adubação nitrogenada utilizada.

*Conclusão* Adubação nitrogenada e a inoculação com *A. brasilense* HM053 promoveram o crescimento vegetal, melhorando a absorção de nutrientes pelas mudas da cultivar RB867515.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Nitrato de amônio. Mini-tolete. Inoculante.

### 4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o principal produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) do mundo, destacando-se na produção de açúcar e etanol (FAOSTAT 2024). Segundo o terceiro levantamento da Conab, com a safra 24/25 ainda em andamento, estima-se uma produção de 678,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar no Brasil e 44,0 milhões de toneladas de açúcar, produzidos a partir de cana-de-açúcar (CONAB 2024).

O sistema de mudas pré-brotadas (MPB) de cana-de-açúcar possui benefícios como redução da quantidade de colmos necessários para o plantio e o controle de doenças na fase de mudas (Landell et al. 2012; Otto et al. 2022). Como é um sistema de produção de mudas a partir de mini-toletes ( $\pm 3$  cm) com uma gema em condições controladas (Landell et al. 2012; Silva et al. 2024), possibilita maior intervenção com produtos biológicos benéficos.

A resposta à adubação depende da cultivar e das condições edafoclimáticas, sendo considerado que a cana-de-açúcar absorve somente cerca de 20-40% do N aplicado a campo (Franco et al. 2011; Otto et al. 2016). Podendo ser beneficiada quando inoculada com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (Silva et al. 2024). Gírio et al. (2015) produziram MPB da cultivar RB867515 inoculadas com um mix de bactérias diazotróficas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *Nitrospirillum amazonense* e *Paraburkholderia tropica*), as mudas com 50 dias foram transferidas para vasos com solo adubado com nitrogênio (50 mg N kg<sup>-1</sup>) e avaliaram até 180 dias. Os resultados demonstraram aumentos no perfilhamento, altura, diâmetro do colmo e na massa seca. Ademais, no trabalho de Gonçalves et al. (2020) a inoculação com *Azospirillum* e a adubação com doses de nitrogênio (30, 60 e 120 mg N kg<sup>-1</sup>) em mudas de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 foi benéfica, resultando em aumentos de crescimento vegetal.

A bactéria *Azospirillum brasilense* cepa HM053 possui a capacidade de excretar amônio e fixar nitrogênio (N<sub>2</sub>) mesmo na presença de altas concentrações de amônio devido a uma mutação natural (Machado et al. 1991; Santos et al. 2017a). A cepa HM053 quando inoculada em setária em cultivo *in vitro*, demonstrou fixar N<sub>2</sub> em quantias suficientes para a planta sobreviver (Pankievicz et al. 2015), além de apresentar efeito significativo em variáveis de crescimento em cevada (Santos et al. 2017a), trigo (Santos et al. 2017b), milho (Pedrosa et al. 2019) e em cana-de-açúcar (Paludo et al. 2024). Assim como a inoculação da cepa HM053 e a adubação nitrogenada na dose 30 kg ha<sup>-1</sup> de N em plantas de milho a campo, resultaram em aumentos significativos na produtividade (Pedrosa et al. 2019).

Alguns trabalhos relataram benefícios da inoculação com fertilização nitrogenada em mudas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos (Gírio et al. 2015; Gonçalves et al. 2020; Rossetto et al. 2021). Contudo, em MPB cultivada em tubete ainda é um assunto a ser explorado. Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da bactéria *A. brasilense* cepa HM053 com ou sem adubação nitrogenada no desenvolvimento de MPB de cana-de-açúcar da cultivar RB867515, analisando variáveis de crescimento e nutricionais das plantas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Condições de crescimento da cepa HM053 de *Azospirillum brasilense*

A bactéria *A. brasilense* HM053 (Nif<sup>C</sup>, EDA<sup>R</sup>, NaI<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>) foi caracterizada como um mutante espontâneo da cepa FP2 (Sp7 ATCC 29145, Sm<sup>R</sup>, NaI<sup>R</sup>) (Machado et al. 1991). A

cepa foi cultivada em meio de cultura líquido NFbHPN-Lactato (Machado et al. 1991), acrescido dos antibióticos estreptomicina ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e ácido nalidíxico ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As células bacterianas foram cultivadas sob agitação de 120 rpm a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  por 48 horas. A concentração do inoculante foi de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

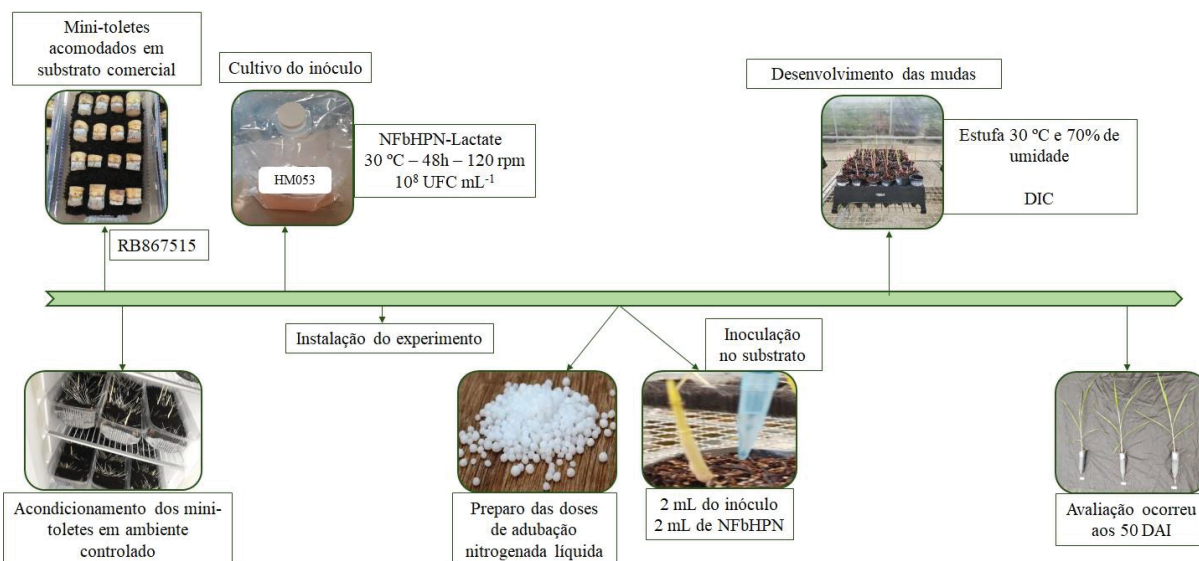
#### 4.2.2 Inoculação, adubação e condições de crescimento das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar

Os mini-toletes da cultivar RB867515 foram cedidos pelo Programa de Melhoramento Genético da Cana-de-Açúcar da Universidade Federal do Paraná e pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (PMGCA/UFPR/RIDESA).

Os mini-toletes de  $\pm 3$  cm cada com uma gema, foram colocados em bandejas (30 x 14 x 9,5 cm) com o substrato comercial Maxfertil® (composição: casca de pinus, fosfato natural, casca de arroz carbonizada, vermiculita, adubo mineral NPK, pH: 6,0). Cada bandeja com 20 mini-toletes, foi acomodada em B.O.D (demanda bioquímica de oxigênio) por um período de 12 dias a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  no escuro.

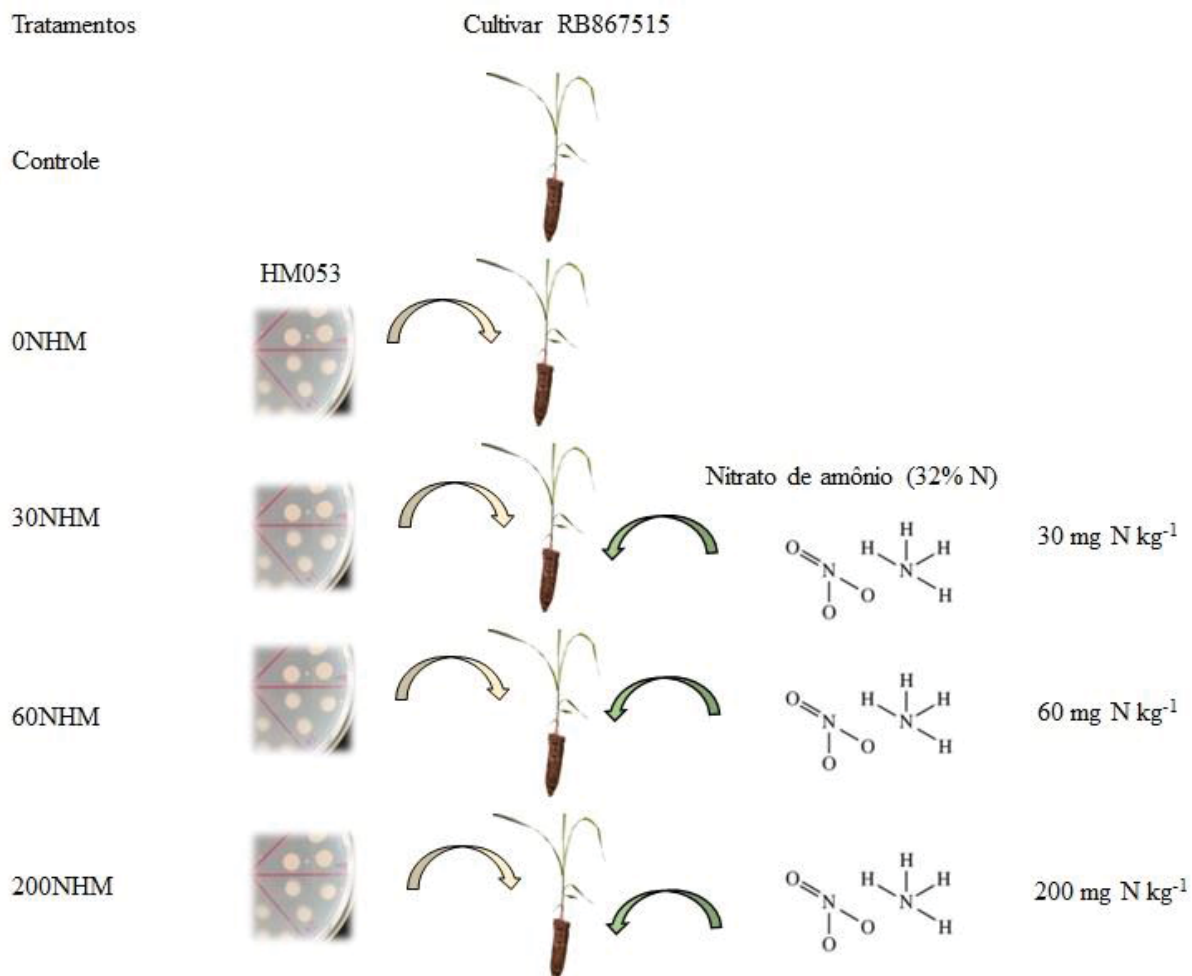
Após o processo de brotação das gemas, os brotos foram individualizados e transplantados para tubetes de  $180 \text{ cm}^3$  com substrato comercial Carolina Soil® (composição: turfa, vermiculita, casca de arroz torrada, calcário; pH: 5,5). Neste momento, foi realizada a adubação nitrogenada do substrato com solução líquida de nitrato de amônio (32% N) para cada dose (30, 60, 200 mg N  $\text{kg}^{-1}$  de substrato). O substrato foi pesado e umedecido com adubo líquido, após seguiu-se para a homogeneização manual. No tratamento controle (sem inoculação bacteriana e sem adubação nitrogenada) e no tratamento com inoculação da cepa HM053 (0 mg N  $\text{kg}^{-1}$  de substrato), os substratos foram umedecidos com água deionizada e homogeneizados.

Após o preenchimento dos tubetes com substrato adubado e o transplântio dos brotos no tubete, foi realizado o processo de inoculação da bactéria *A. brasilense* cepa HM053. Sendo 2 mL de inóculo na concentração  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  por planta, inoculado no substrato. Para o tratamento controle foram aplicados por planta 2 mL de meio de cultura NFbHPN esterilizado. Os brotos foram acomodados em estufa com controle de temperatura e de umidade ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 70% de umidade) no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), localizado na cidade de Curitiba, Paraná (Fig. 4-1).



**Fig. 4-1** Representação da condução do experimento mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com *Azospirillum brasilense* HM053 e adubadas com nitrogênio. A cultivar utilizada foi RB867515. rpm – rotação por minuto. UFC – unidade formadora de colônias. Fonte da adubação nitrogenada – nitrato de amônio. DIC – delineamento inteiramente casualizado. DAI – dias após inoculação

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado entre os meses de novembro de 2022 a fevereiro 2023, sendo constituído de 5 tratamentos: controle (sem inoculação bacteriana e sem adubação nitrogenada), tratamento com inoculante e sem adubação nitrogenada (0NHM), com 30 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato e inoculante (30NHM), com 60 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato e inoculante (60NHM) e com 200 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato e inoculante (200NHM) (Fig. 4-2). Foram utilizadas 6 repetições por tratamento, cada uma das 30 parcelas foi constituída por 5 plantas, totalizando 150 plantas no experimento. As mensurações das variáveis de crescimento e nutricionais ocorreram 50 dias após inoculação (DAI).



**Fig. 4-2** Representação dos tratamentos aplicados nas mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar cultivar RB867515. Tratamento Controle: sem adubação nitrogenada e sem inoculação de *A. brasilense* cepa HM053. Tratamento 0NHM: com inoculação da cepa HM053 e 0 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato. Tratamento 30NHM: com inoculação da cepa HM053 e aplicação de 30 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato. Tratamento 60NHM: com inoculação da cepa HM053 e aplicação de 60 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato. Tratamento 200NHM: com inoculação da cepa HM053 e aplicação de 200 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato

#### 4.2.3 Variáveis de crescimento e nutricionais avaliadas em MPB de cana-de-açúcar

Aos 50 DAI foram mensuradas em cada planta das parcelas as seguintes variáveis: altura da parte aérea da planta (APA) em centímetros, considerando a base do colmo até a dewlap da folha +1, diâmetro na base do colmo (DC) em centímetros, medido com o auxílio de um paquímetro digital e número de folhas (NF) considerando folhas verdes totalmente expandidas.

Para as análises destrutivas aos 50 DAI, todas as mudas das parcelas foram retiradas dos tubetes e lavadas em água corrente sob peneira (2 mm mesh), para retirar todo o substrato sem causar danos ao sistema radicular. A massa seca da raiz (MSR) em gramas e a massa seca

da parte aérea (MSPA) em gramas foram obtidas com a secagem em estufa com circulação de ar a 52 °C até peso constante, o material vegetal foi pesado em balança analítica.

As raízes das mudas de cana-de-açúcar foram analisadas utilizando o *software* WinRHIZO™ (Regent Instruments 2013), acoplado a um scanner de imagem conforme descrito por dos Santos et al. (2019). Foram considerados o comprimento da raiz (CR) em centímetros, área superficial da raiz (ASR) em centímetros quadrados, volume da raiz (VR) em centímetros cúbicos e o comprimento da raiz por classe de diâmetro em centímetro. O comprimento da raiz foi classificado da seguinte forma: comprimento de raiz muito fina (CRMF) (< 0,5 mm) e comprimento de raiz fina (CRF) (> 0,5 a < 1,5 mm).

As análises nutricionais foram realizadas no Laboratório de Nutrição de Plantas da UFPR, Curitiba. Para obtenção do teor de nitrogênio (N), a parte aérea das mudas (colmo e folhas) foram trituradas e pesadas (0,1 g) e submetidas à técnica de micro-Kjeldahl (Tedesco et al. 1995). Para o teor dos nutrientes: fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg), cálcio (Ca), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn), as amostras (parte aérea das mudas) foram trituradas e pesadas (0,5 g), acomodadas em cadinhos de porcelana e submetidas à digestão ácida seca (Martins e Reissmann 2007), após foram analisadas pelo sistema de emissão óptica espectrômetro com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP-OES; modelo: Varian 720-ES).

Após a obtenção dos valores dos teores de nutrientes, foi calculado o conteúdo de nutrientes na parte aérea das mudas. Esta variável foi avaliada por meio da fórmula:

$$\frac{TN \times MSPA}{1000}$$

em que TN = teor de cada nutriente da parte aérea da planta, MSPA = massa seca da parte aérea da planta. O índice de uso eficiente dos nutrientes (IUE) também foi calculado seguindo a fórmula:

$$\frac{(MSPA)^2}{CN}$$

em que CN = conteúdo nutricional. As avaliações nutricionais, foram avaliadas com 6 repetições para cada tratamento, sendo cada parcela constituída por 5 plantas.

#### 4.2.4 Análises estatísticas

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de Bartlett para verificar a homogeneidade de variâncias dos tratamentos, em seguida foi realizada análise de variância, a partir do desdobramento dos graus de liberdade e da soma de quadrados de tratamento visando testar os contrastes ortogonais apresentados na tabela 4-1.

**Tabela 4-1.** Representação dos grupos de médias comparados na análise de contrastes ortogonais.

Contraste 1	Controle	<i>versus</i>	0NHM, 30NHM, 60NHM e 200NHM
Contraste 2	0NHM	<i>versus</i>	30NHM, 60NHM e 200NHM
Contraste 3	30NHM e 60NHM	<i>versus</i>	200NHM
Contraste 4	30NHM	<i>versus</i>	60NHM

Controle - sem N e sem inoculante (cepa HM053); 0NHM - sem N e com inoculante; 30NHM - 30 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato e inoculante; 60NHM - 60 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato e inoculante; 200NHM - 200 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato e inoculante.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* R (R Development Core Team, 2023).

#### 4.3 RESULTADOS

Dentre as variáveis de crescimento e nutricional mensuradas, de acordo com o teste F a 5% de probabilidade, o contraste 1 (C1 - Controle não inoculado e não adubado *versus* 0NHM, 30NHM, 60NHM e 200NHM) foi significativo para DC, NF e VR (Tabela 4-2), teores de P, Cu, Fe (Tabela 4-3) e no conteúdo nutricional de Cu e Fe (Tabela 4-4). Nas variáveis DC e VR, os contrastes que compararam a adubação nitrogenada com inoculação não variaram significativamente (C2, C3 e C4), demonstrando que o aumento significativo observado nas mudas ocorreu devido a inoculação com a cepa HM053, independente das doses de adubação nitrogenada utilizadas. A média de DC de plantas tratadas com HM053 foi 12,9% maior do que em relação a plantas controle. Para o VR o aumento foi de 30,1% em plantas inoculadas em relação ao controle. Para NF a média das plantas tratadas com HM053 foi ~9% superior à média das plantas controle.

Para o teor e conteúdo nutricional de Fe e Cu a presença da cepa HM053 nas mudas de cana-de-açúcar causou uma diminuição significativa quando comparadas as plantas controle. A média de teor de Cu e Fe (Tabela 4-2) para plantas controle foi 161% e ~24% superior à média do grupo com os tratamentos que receberam inoculante. O conteúdo de Cu e Fe (Tabela 4-3) na parte aérea das mudas de cana-de-açúcar reduziu em 62% e 22,5% quando

as plantas foram inoculadas, independente da adubação nitrogenada em comparação com plantas controle.

O C2 (0NHM *versus* 30NHM, 60NHM e 200NHM) foi significativo para os teores de P e K (Tabela 4-3). Apresentando um aumento de 8,3% e 4,1% respectivamente, quando as mudas foram adubadas, independente da dose utilizada e inoculadas com a cepa HM053.

O C3 (30HM e 60HM *versus* 200NHM) foi significativo para os teores de P, K, Mg (Tabela 4-3). O teor de P aumentou devido a presença do inoculante em ~8,2% com relação as plantas controle. Contudo, o efeito da aplicação de N também foi significativo aumentando os teores de P, K e reduzindo o teor de Mg na dose mais alta (200 mg N kg<sup>-1</sup>). O teor de P das plantas do tratamento 200NH foi aproximadamente 11,5% maior do que o grupo de mudas que receberam os tratamentos 30NH e 60NH. Para teor de K a média do tratamento 0NHM foi inferior estatisticamente a média do grupo com doses de adubação nitrogenada e inoculante. Sendo a média maior de teor de K em plantas que receberam o tratamento 200NHM em comparação com as médias dos demais tratamentos. Ao contrário, para o teor de Mg a média do tratamento 200NHM foi inferior à média do grupo dos tratamentos 30NHM e 60NHM.

O C4 (30HM *versus* 60HM) foi significativo para as variáveis NF (Tabela 4-2), teor de K e conteúdo de N (Tabela 4-3, Tabela 4-4). Para a variável NF, a dose de N de 30 mg kg<sup>-1</sup> resultou em aumento de ~12% em NF quando comparado ao grupo de média da dose 60 mg kg<sup>-1</sup>. Para o conteúdo de N na parte aérea das mudas de cana-de-açúcar ocorreu diferença entre as médias do tratamento 30NHM e 60NHM, sendo a maior média a dose 30 mg de N kg<sup>-1</sup> de substrato. Demonstrando que o efeito positivo foi promovido pela adubação nitrogenada na menor dose.

O IUE foi significativo para Cu e Fe, sendo observado um aumento de ~160% e 34% respectivamente, nas mudas inoculadas com ou sem adubação nitrogenada, em comparação às mudas controle (Tabela 4-5).

**Tabela 4-2.** Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para variáveis de crescimento de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com *A. brasilense* cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg<sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada).

Avaliações de crescimento vegetal			
Contrastes dos grupos de médias	DC	NF	VR
	cm	un	cm <sup>3</sup>
C1	0,7-0,8*	3,1-3,4*	4,6-6,0*
C2	0,8-0,8	3,3-3,4	5,4-6,1
C3	0,8-0,8	3,3-3,6	6,0-6,3
C4	0,8-0,8	3,5-3,1*	5,6-6,4
Resíduo	0,006	0,08	1,3
Média Geral	0,8	3,3	5,7
CV (%)	9,6	8,4	20,2

CV – coeficiente de variação. C1 - Controle versus 0NHM, 30NHM, 60NHM e 200NHM; C2 - 0NHM versus 30NHM, 60NHM e 120NHM; C3 - 30NHM e 60NHM versus 200NHM; C4 - 30NHM versus 60NHM. DC – diâmetro do colmo, NF – número de folhas, VR – volume da raiz.. \*Significativo de acordo com o teste F de Snedecor (p<0,05).

**Tabela 4-3.** Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para o teor de nutrientes de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com *A. brasilense* cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg<sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada).

Teor de nutrientes						
Contrastes dos grupos de médias	N	P	K	Cu	Fe	Mn
	g planta <sup>-1</sup>			mg planta <sup>-1</sup>		
C1	17,6-16,9	4,7-5,1*	20,0-20,2	13,4-5,1*	80,3-61,1*	93,5-89,1
C2	17,6-16,6	4,8-5,2*	19,6-20,4*	5,5-5,0	65,6-59,6	91,3-88,4
C3	16,8-16,4	4,9-5,6*	20,1-20,9*	5,1-4,8	60,9-59,6	92,9-79,4*
C4	17,1-16,4	4,8-5,1	19,7-20,5*	5,4-4,7	61,3-60,5	93,2-92,6
Resíduo	3,6	0,1	0,4	2,0	121,7	139,0
Média Geral	17	5	20,1	6,8	64,9	90
CV (%)	11,2	6,6	3,1	20,6	17	13,1

CV – coeficiente de variação. C1 - Controle versus 0NHM, 30NHM, 60NHM e 200NHM; C2 - 0NHM versus 30NHM, 60NHM e 120NHM; C3 - 30NHM e 60NHM versus 200NHM; C4 - 30NHM versus 60NHM. P – fósforo, K – potássio, Cu – cobre, Fe – ferro, Mg – magnésio. \*Significativo de acordo com o teste F de Snedecor (p<0,05).

**Tabela 4-4.** Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para conteúdo nutricional de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com *A. brasilense* cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg<sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada).

Conteúdo nutricional			
Contrastes dos grupos de médias	N	Cu	Fe
	mg planta <sup>-1</sup>		
C1	33,9-33,0	0,03-0,01*	0,15-0,12*
C2	34,1-32,6	0,01-0,01	0,13-0,12
C3	32,7-32,4	0,01-0,01	0,12-0,11
C4	35,7-29,8*	0,01-0,01	0,13-0,11
Resíduo	23,5	0,00001	0,0008
Média Geral	33,2	0,01	0,13
CV (%)	14,6	31,9	21,4

CV – coeficiente de variação. C1 - Controle versus 0NHM, 30NHM, 60NHM e 200NHM; C2 - 0NHM versus 30NHM, 60NHM e 120NHM; C3 - 30NHM e 60NHM versus 200NHM; C4 - 30NHM versus 60NHM. N – nitrogênio, Cu – cobre, Fe – ferro. \*Significativo de acordo com o teste de F de Snedecor (p<0,05).

**Tabela 4-5.** Grupos de médias dos contrastes ortogonais testados para índice de uso eficiente de nutrientes de mudas de cana-de-açúcar (cultivar RB867515), inoculado com *A. brasilense* cepa HM053 e adubadas com quatro doses de nitrogênio (0, 30, 60, 200 mg N kg<sup>-1</sup> substrato), além do grupo controle (sem inoculante e sem adubação nitrogenada).

Contrastes dos grupos de médias	IUE	
	Cu	Fe
	----- mg planta <sup>-1</sup> -----	
C1	149,8-389,3*	24,7-33,2*
C2	358,3-399,6	31,5-33,7
C3	383,2-432,4	32,4-36,5
C4	378,5-387,7	34,3-30,4
Resíduo	7053,7	60,5
Média Geral	341,4	31,5
CV (%)	24,6	24,7

CV – coeficiente de variação. C1 - Controle versus 0NHM, 30NHM, 60NHM e 200NHM; C2 - 0NHM versus 30NHM, 60NHM e 120NHM; C3 - 30NHM e 60NHM versus 200NHM; C4 - 30NHM versus 60NHM. IUE – índice de uso eficiente de nutrientes. Cu – cobre. Fe – ferro. \*Significativo de acordo com o teste de F de Snedecor (p<0,05).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Para interpretar e validar resultados científicos são utilizadas abordagens estatísticas robustas, como a análise de contrastes ortogonais. Esta análise permite testar hipóteses direcionadas dentro de cada grupo, contribuindo para o aumento do poder estatístico (Nogueira 2004). Outros trabalhos também utilizaram contrastes ortogonais em suas avaliações e consideraram uma análise adequada para interpretação dos dados (Arshad et al. 2020; Costa et al. 2021; Sahoo et al. 2021; Viator et al. 2005).

Os aumentos significativos nas médias das variáveis de crescimento (Tabela 4-2) e nutricionais (Tabela 4-3, Tabela 4-4) em plantas inoculadas no presente estudo, possivelmente devem-se a indução de reguladores vegetais promovida pela bactéria na planta (Carvalho et al. 2014). O gênero *Azospirillum* é reconhecido principalmente pela biossíntese do hormônio ácido indol-acético (AIA) (Cassán et al. 2014; Cassán et al. 2020). O sistema radicular é a principal estrutura vegetal alterada quando inoculado a bactéria *Azospirillum*, aumentando raízes laterais, número de pelos radiculares, ramificação dos pelos e aumento da superfície e do volume da raiz (Cassán et al. 2020). Destaca-se que no presente trabalho ocorreu aumento de volume radicular e a partir deste aumento, pôde melhorar a absorção de nutrientes e água.

O status de N da planta pode atuar como um sinal-chave, regulando e integrando vários processos metabólicos que ocorrem durante a associação com bactérias diazotróficas. Existem evidências que o teor de N no solo pode favorecer o processo de colonização bacteriana, assim como, juntamente com os hormônios vegetais, participa da promoção do desenvolvimento vegetal (Carvalho et al. 2014). O uso de adubação nitrogenada com bactérias benéficas promove o crescimento vegetal e melhora a absorção de nutrientes, estimulando assim, a expressão do potencial genético da planta.

O *A. brasilense* é uma das BPCV mais estudadas (Cassán et al., 2020), sendo considerada modelo para estudos científicos. Barbosa et al. (2022), por meio de meta-análise afirmam que o *A. brasilense* torna a adubação nitrogenada mais eficiente. Assim como, no trabalho de Hungria et al. (2022), a inoculação com *A. brasilense* e doses de adubação nitrogenada 0, 50, 75 e 100% (90 kg N ha<sup>-1</sup>) em milho a campo, em 30 ensaios em 13 locais do Brasil, observaram que é possível reduzir cerca de 25% da dose completa. Vale ressaltar a importância específica da interação cepa-genótipo (Lopes et al. 2019; Paludo et al. 2024), sendo necessário encontrar a cepa mais eficiente para cada cultura e cultivar.

No presente estudo, mudas que foram inoculadas com HM053 e adubadas com a dose 30 mg N kg<sup>-1</sup> de substrato apresentaram aumento significativo no NF (Tabela 4-2) e no conteúdo de N (Tabela 4-4) na parte aérea de mudas de cana-de-açúcar. A cultivar RB867515 já demonstrou responder à inoculação com BPCV com o aumento no acúmulo de N na parte aérea de MPB de cana-de-açúcar (Santos et al. 2019). Porém, no presente estudo o acúmulo de N foi significativo quando as mudas foram inoculadas e adubadas na menor dose. A cultivar RB867515 é indicada para cultivo em solos com baixa fertilidade (Oliveira; Barbosa; Daros, 2021), ou seja, é uma cultivar responsiva em baixas doses de adubação nitrogenada.

A característica de ser responsiva em menores doses é observada nesta cultivar quando submetida a diferentes tecnologias de manejo agrícola, como: adubação nitrogenada em sistema hidropônico (dos Santos et al. 2020), adubação fosfatada (Calheiros et al. 2017), irrigação (Andrade Junior et al. 2017), entre outras. Portanto, é uma cultivar interessante para estudos científicos que buscam otimizar manejo agrônomico e trazer maior sustentabilidade para o cultivo, pois não é necessário fomentar a planta com doses altas para obter respostas fisiológicas.

É recomendado o uso da adubação nitrogenada em MPB e em viveiros com produção de mudas de cana-de-açúcar (Landell et al. 2012; Xavier et al. 2020). As fontes e doses de adubação nitrogenada em mudas são variáveis. Conforme a literatura científica, em MPB de cana-de-açúcar inoculadas com BPCV e adubadas com nitrogênio, as doses variam entre 50 e 120 mg kg<sup>-1</sup> de solo (Cipriano et al. 2021; Gírio et al. 2015; Gonçalves et al. 2020), contudo, vale ressaltar que os estudos utilizaram MPB, mas aplicaram adubação nitrogenada em vasos com solo. O Brasil utiliza as menores doses de adubação nitrogenada a campo em comparação com os demais países produtores de cana-de-açúcar, aplicando em média 60-120 kg N ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (Otto et al. 2016; Spironello et al. 1997). Portanto, se faz necessário o estudo da melhor dose e fonte de adubação nitrogenada com BPCV para uso em viveiros de cana-de-

açúcar, visando um manejo nutricional mais eficiente e sustentável nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura.

Os teores de Cu e Fe (Tabela 4-3), e o conteúdo desses micronutrientes (Tabela 4-4) da parte aérea das MPB de cana-de-açúcar, foram reduzidos quando as plantas foram inoculadas com ou sem adubação nitrogenada. No trabalho de Paludo et al. (2024), em MPB de cana-de-açúcar somente inoculada com HM053, foi observado que independente da cultivar o fator inoculante (HM053), reduziu os teores de Fe. Pedrosa et al. (2019) em plantas de milho a campo inoculadas com HM053 e adubadas com 30 kg N ha<sup>-1</sup>, não encontraram diferenças significativas nos teores de Cu e Fe nas folhas. Ao contrário, Housh et al. (2021a) avaliaram mudas de milho com 15 dias de idade, cultivado em aeroponia e inoculado com HM053, observaram aumento significativo da concentração Fe na planta.

Apesar da redução nos teores de Cu e Fe não foram observados de forma visível deficiência nutricional nas mudas de cana-de-açúcar aos 50 DAI, no trabalho de Paludo et al. (2024) e no presente estudo. Porém, o IUE (Tabela 4-5) para Cu e Fe foram significativos quando as mudas receberam adubação e inoculação com a cepa HM053, demonstrando maior eficiência na produção de massa seca por unidade de nutriente absorvido quando comparado com mudas controle. Este resultado evidencia o efeito da bactéria nas mudas.

Os teores de referência para interpretar análise foliar em plantas de cana-de-açúcar cultivadas a campo são: Cu (6-15 mg kg<sup>-1</sup>) e Fe (40-250 mg kg<sup>-1</sup>) (Pauletti e Motta 2019). A média dos valores encontrados na parte aérea das mudas avaliadas aos 50 DAI inoculadas e adubadas com nitrogênio, independente da dose utilizada foi: Cu (5,1 mg kg<sup>-1</sup>) e Fe (61,1 mg kg<sup>-1</sup>) (Tabela 4-3), portanto pode-se considerar que os valores estão entre o limite aceitável. Ademais, Cipriano et al. (2021) avaliaram o conteúdo nutricional de mudas de cultivares IAC de cana-de-açúcar inoculadas com um mix de bactérias (*G. diazotrophicus*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *N. amazonense* e *P. tropica*) e adubadas com nitrato de amônio (116,7 mg N kg<sup>-1</sup>) cultivadas em vaso de 3 L avaliando as mudas aos 45 DAI. A média do conteúdo de Fe variou entre 0,22-0,32 mg planta<sup>-1</sup> e Cu variou entre 0,02-0,04 mg planta<sup>-1</sup>. Os valores do presente estudo (Tabela 4-4) estão próximos aos valores observados por Cipriano e colaboradores, o mesmo ocorre com teor dos nutrientes (Tabela 4-3), devendo levar em consideração que são cultivares e métodos de cultivo diferentes.

A cepa HM053 possui como característica a capacidade de excretar amônio e fixar N mesmo em altas concentrações de amônio (Machado et al. 1991; Santos et al. 2017a), devido a isso, o presente estudo avaliou uma dose considerada alta para as condições do experimento. Contudo, a resposta nutricional das mudas demonstrou que o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> utilizado na fonte de

adubação e a excreção da bactéria no substrato, possivelmente interagiram no processo de absorção dos cátions  $\text{Fe}^{2+/3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  conforme o aumento da dose de adubação (Tabela 4-3; Tabela 4-4; Fig. 4-3). Tais cátions são absorvidos por meio de transportadores (Marschner, 2012), assim como  $\text{NH}_4^+$ , ocorrendo uma competição do sítio de absorção. Contudo, o  $\text{K}^+$  (Tabela 4-3; Fig. 4-3) não foi afetado pela alta concentração de  $\text{NH}_4^+$ , pois a sua absorção pela planta ocorre por meio de proteínas canais (Marschner, 2012). Sendo assim, não competindo com o  $\text{NH}_4^+$  e apresentando aumento na sua absorção conforme aumentou a adubação nitrogenada.

É importante realizar o estudo dos nutrientes em teor, conteúdo nutricional e IUE, pois, são fundamentais para compreender a resposta da planta quando submetida aos tratamentos. O teor do nutriente, por sua vez é a quantia do nutriente em kg da parte aérea. O conteúdo nutricional refere-se à quantidade de um elemento mineral na parte aérea da muda no momento da coleta do experimento. O IUE de nutrientes é utilizado para compreender a eficiência de absorção dos nutrientes pela planta, portanto se a muda produz mais massa seca na parte área com menos nutrientes, possibilita o ajuste do manejo nutricional, com redução de fertilizantes químicos e maior sustentabilidade para o sistema.

## CONCLUSÃO

O uso de adubação nitrogenada com a inoculação de *A. brasilense* HM053 promoveu o crescimento e melhorou a absorção de nutrientes em MPB da cultivar RB867515.

## REFERÊNCIAS

- Andrade Junior AS, Bastos ED, Ribeiro VQ, Athayde Sobrinho C, Silva PHS (2017) Stalk yield of sugarcane cultivars under different water regimes by subsurface drip irrigation. *Rev Bras Eng Agríc Ambient* 21(3):169-174. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n3p169-174>
- Arshad M, Ahmad S, Shah GA, Nawaz R, Ali S (2020) Growth and yield performance of *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek influenced by altitude, nitrogen dose, planting pattern and time of sowing under sole and intercropping with maize. *Biotechnol Agron Soc Environ* 24(3):142–155. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.18577>
- Barbosa JZ, Roberto LA, Hungria M, Corrêa RS, Magri E, Correia TD (2022) Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. *Appl Soil Ecol* 170:104276. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104276>

- Calheiros AS, Oliveira MW, Ferreira VM, Barbosa GVS, Santiago AD, Aristides EVS (2012) Production of biomass, from sugar and protein in function of sugarcane varieties and phosphorous fertilization. *Semin Ciênc Agrar* 33(2):809-818. 10.5433/1679-0359.2012v33n2p809
- Carvalho TLG, Balsemão-Pires E, Saraiva RM, Ferreira PCG, Hemerly AS (2014) Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *J Exp Bot* 65(19):5631–5642. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>
- Cassán F, Vanderleyden, J, Spaepen S (2014) Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J Plant Growth Regul* 33:440–459. 10.1007/s00344-013-9362-4
- Cassán, F, Coniglio A, López G et al (2020) Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biol Fertil Soils* 56:461-479. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>
- Cipriano MAP, Freitas-Iório RP, Dimitrov MR, Andrade SAL, Kuramae EE, Silveira APD (2021) Plant-growth endophytic bacteria improve nutrient use efficiency and modulate foliar n-metabolites in sugarcane seedling. *Microorganisms* 9:479. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030479>
- CONAB (2024) *Acompanhamento safra brasileira de cana-de-açúcar – Safra 2023/24*. 4 - Quarto levantamento. Brasília 1–52.
- Costa MS, Rolim MM, Silva GF, Simões Neto DE, Pedrosa EMR (2021) Nutrient content and accumulation in sugarcane under mineral fertilization and high doses of vinasse. *Semin Ciênc Agrar* 42:565–582. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n2p565>
- FAOSTAT (2024) Production - Crops and livestock products <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize> Acessado em 24 set 2024.
- Franco HCJ, Otto R, Faroni CE, Vitti AC, Oliveira ECA, Trivelin PCO (2011) Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under brazilian field conditions. *Field Crops Res* 121:29-41. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.11.011>
- Gírio LAS, Dias FLF, Reis VM, Urquiaga S, Schultz N, Bolonhezi D, Mutton MA (2015) Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization effect on the initial growth of sugarcane from pre-sprouted seedlings. *Pesqui Agropecu Bras* 50(1):33-43. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2015000100004>
- Gonçalves MC, Silva KC, Oliveira CES, Steiner F (2020) Nitrogênio e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar. *Colloq Agrar* 16(2):72-81. <https://doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n2.a360>
- Housh AB, Powell G, Scott S et al (2021a) Functional mutants of *Azospirillum brasilense* elicit beneficial physiological and metabolic responses in *Zea mays* contributing to increased host iron assimilation. *ISME J* 15:1505–1522. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00866-x>
- Housh AB, Benoit M, Wilder SL, Scott S, Powell G, Schuller MJ, Ferrieri RA (2021b) Plant-growth-promoting bacteria can impact zinc uptake in *Zea mays*: An examination of the mechanisms of action using functional mutants of *Azospirillum brasilense*. *Microorganisms* 9:1002. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051002>

- Hungria M, Barbosa JZ, Rondina ABL, Nogueira MA (2022) Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. *J Soil Sci Plant Nutr* 114:2969–2980. [10.1002/agj2.21150](https://doi.org/10.1002/agj2.21150)
- Landell MGA, Campana MP, Figueiredo P, Xavier MA, Anjos IA et al (2012) Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas. Campinas: Instituto Agrônomo, p 16.
- Lopes VR, Bernaldo Filho JC, Figueiredo GGO, Oliveira RA, Daros E (2019) Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. *Semin Cienc Agrar* 40 (2): 527-538. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n2p527>
- Machado HB, Funayama S, Rigo LU, Pedrosa FO (1991) Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. *Can J Microbiol* 37:549-553. <https://doi.org/10.1139/m91-092>
- Marschner P (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier. 3 ed. Australia.
- Martins APL, Reissmann CB (2007) Laboratory routine for chemical and analytical procedures on plant tissues. *Sci Agric* 8(1):1-17.
- Nogueira MCS (2004) Orthogonal contrasts: definitions and concepts. *Sci Agric* 61:118–124. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162004000100020>
- Oliveira RA, Barbosa GVS, Daros E (2021) 50 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 30 anos de RIDESA. Curitiba: RIDESA.
- Oliver R, Silva MA (2018) Interaction between diazotrophic bacteria and N-fertilizer doses on sugarcane crop. *J Plant Nutr* <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425436>
- Otto R, Castro SAQ, Mariano E, Castro SGQ, Franco HCJ, Trivelin PCO (2016) Nitrogen use efficiency for sugarcane-biofuel production: what is next? *Bioenergy Res* 9:1272–1289. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9763-x>
- Otto R, Machado BA, Silva ACM, Castro SGQ, Lisboa IP (2022) Sugarcane pre-sprouted seedlings: A novel method for sugarcane establishment. *Field Crops Res* 275:108336. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108336>
- Paludo F, Chaves RBR, Wustro IC, Brasileiro BP, Oliveira RA, Bernaldo Filho JC (2024) Growth and nutritional content of pre-sprouted seedlings of five sugarcane cultivars inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7, and HM053 strains. *Sugar Tech*. <https://doi.org/10.1007/s12355-024-01525-7>
- Pankievicz VCS, Amaral FP, Santos KFDN et al (2015) Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. *Plant J* 81:907–919. <https://doi.org/10.1111/tpj.12777>
- Pauletti V, Motta ACV (2019) Manual de Adubação e Calagem para o Estado do Paraná. In: Calagem e adubação para outras espécies de importância econômica cultivadas no estado do Paraná, 2ª ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Curitiba, pp 275-289
- Pedrosa FO, Oliveira ALM, Guimarães VF et al (2019) The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. *Plant Soil*. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>
- R development core team. 2023. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acessado em: 24 Nov. 2024.

- Regent Instruments (2023) WinRhizoTron.  
<http://www.regentinstruments.com/products/rhizo/RHIZOTorn.html> Acessado em 24 Nov 2024.
- Rossetto L, Pierangeli GMF, Kuramae EE, Xavier MA, Cipriano MAP, Silveira APD (2021) Sugarcane pre-sprouted seedlings produced with beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. *Bragantia* 80. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200276>
- Sahoo G, Swamy SL, Sungh AK, Mishra A (2021) Propagation of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre: Effect of auxins, age, season and C/N ratio on rooting of stem cuttings. *Trees For People* 5:100091. <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2021.100091>
- Santos ARS, Etto RM, Furmam RW et al (2017a) Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. *Plant Physiol Biochem* 118:422-426. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.003>
- Santos KFDN, Moure VR, Hauer V et al (2017b) Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. *Plant Soil* 415:245–255. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3140-6>
- dos Santos SG, Ribeiro F, Alves GC, Santos LA, Reis VM (2020) Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. *Plant Soil* 451:25–44. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04101-1>
- dos Santos SG, Chaves VA, Ribeiro FS, Alves GC, Reis VM (2019) Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. *Appl Soil Ecol* 133:12-23. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.015>
- Silva FC, Luchiari Júnior A, Freitas PL, Pereira W, Coleti JT, Rodrigues GC, Carvalho ML, Chistofoleti D (2024) Produção, plantio e condução de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. *In: Silva FC, Freire FJ Inovação e desenvolvimento em cana-de-açúcar manejo, nutrição, bioinsumos, recomendação de corretivos e fertilizantes*. Brasília: Embrapa.
- Spironello A; Raij B, Penatti CP, Cantarella H, Morelli JLM, Orlando Filho J, Landell MGA, Rossetto R (1997) Sugarcane crop. *In: Van Raij B, Cantarella H, Quaggio JÁ, Furlani AMC. Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo, 2<sup>nd</sup> ed.* Campinas: Instituto Agrônômico.
- Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ (1995) Análise de solo, planta e outros materiais. *2<sup>a</sup> Edição Revidada e Ampliada*. Porto Alegre
- Viator RP, Nuti R, Wells R, Edmisten K (2005) Stem and root carbohydrate dynamics in modern vs. obsolete cotton cultivars. *Commun Soil Sci Plant Anal* 36:2165–2177. <https://doi.org/10.1080/00103620500196366>
- Xavier MA, Landell MGA, Pires RCM, Rossetto R, Dinardo-Miranda LL, Perecin D et al (2020) Gemas brotadas de cana-de-açúcar: produção sustentável e utilização experimental na formação de áreas de multiplicação. 115 Campinas: Instituto Agrônômico.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que as mudas de cana-de-açúcar foram beneficiadas quando inoculadas com *A. brasilense*. A partir dos resultados obtidos por meio deste estudo, foi demonstrado a importância do genótipo na resposta ao inoculante, pois, os resultados variaram conforme a cultivar utilizada. Devido o cultivo de MPB ser rápido (em média 50 dias), é necessário que os microrganismos benéficos tenham afinidade com a planta e interajam beneficiando-a neste curto período.

A cepa HM053 promoveu benefícios nas mudas, contudo se faz necessário a continuidade dos estudos e avaliações para determinar as cultivares mais responsivas e confirmar a promoção de crescimento vegetal em MPB de cana-de-açúcar pela cepa. O uso de adubação nitrogenada associada com HM053 promoveu aumentos significativos em variáveis de crescimento e nutricional na cultivar RB867515. Resultados interessantes foram encontrados quando avaliado a parte nutricional da parte aérea das mudas de cana-de-açúcar inoculadas com HM053.

Sugere-se o aumento do número de plantas por parcela para trabalhos futuros, assim como, avaliar o desempenho das mudas inoculadas a campo podem favorecer a obtenção de respostas. Uma possibilidade de trabalhos subsequentes seria testar diferentes doses de N com e sem o inoculante. Ademais, avaliar por meio de bactéria marcada a colonização radicular da cepa HM053 e quantificar o número de células viáveis ao longo do período de cultivo das mudas de cana-de-açúcar, podem contribuir com informações importantes.

## 6 REFERÊNCIAS GERAIS

- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: Roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196–208, Feb. 2014. DOI. 10.1111/1751-7915.12117.
- AMORIM, F. R.; PATINO, M. T. O.; BARTMEYER, P. M.; SANTOS, D. F. L. Productivity and profitability of the sugarcane production in the state of São Paulo, Brazil. **Sugar Tech**, v. 22, n. 4, p. 596–604, 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00813-2>.
- ANDRADE JUNIOR, A. S.; BASTOS, E. D.; RIBEIRO, V. Q.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; SILVA, P. H. S. Stalk yield of sugarcane cultivars under different water regimes by subsurface drip irrigation. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 169-174, Feb. 2017. DOI. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n3p169-174>.
- ANPII. 2024. Análises e estatísticas 2023. Disponível em: <https://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 24 jul. 2024.
- ARAÚJO, L. M.; MONTEIRO, R. A.; SOUZA, E. M.; *et al.* GlnB is specifically required for *Azospirillum brasilense* NifA activity in *Escherichia coli*. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 6, p. 491–495, Jul. 2004. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.03.002>.
- ARCONDÉGUY, T.; JACK, R.; MERRICK, M. P. II Signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, n. 1, p. 80–105, Mar. 2001. DOI. <https://doi.org/10.1128/mmbr.65.1.80-105.2001>.
- ARSENE, F.; KAMINSKI, P. A.; ELMERICH, C. Modulation of NifA activity by P(II) in *Azospirillum brasilense*: Evidence for a regulatory role of the NifA N-terminal domain. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 16, p. 4830–4838, Ago.1996. DOI. <https://doi.org/10.1128/jb.178.16.4830-4838.1996>.
- ARSHAD, M.; AHMAD, S.; SHAH, G. A.; NAWAZ, R.; ALI, S. Growth and yield performance of *Vigna radiata* (L.) R. Wilczek influenced by altitude, nitrogen dose, plantin pattern and time of sowing under sole and intercropping with maize. **Biotechnology, Agronomy, Society Environment**, v. 24, n. 3, p. 142–155, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.18577>.
- BARBOSA, J. Z.; ROBERTO, L. DE A.; HUNGRIA, M.; *et al.* Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, Set. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104276>.
- BASHAN Y., DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth - a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, Set. 2010. DOI. [https://doi.org/10.1016/s0065-2113\(10\)08002-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2113(10)08002-8).
- BATISTA, L. G.; MELLO, V. H.; SOUZA, A. P.; MARGARIDO, G. R. A. Genomic prediction with allele dosage information in highly polyploid species. **Theoretical and**

**Applied Genetics**, v. 135, n. 2, p. 723–739, Fev. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03994-w>.

BEIJERINCK M. W. Uber ein *Spirillum*, welches freien Stickstotlbinden kann? **Zmtbl. Bakt. ParasitKde**, v. 11, n. 63, p. 353-359. 1925.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. P. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. **Environmental Microbiology**, v. 2641, p. 45–47, Mai. 1989. DOI. 10.1104/pp.90.1.45.

BRAGA JUNIOR, R. L. C.; LANDELL, M. G. A.; XAVIER, M. A.; KANTHACK, R. A. D.; SILVA, D. N.; BIDÓIA, M. A. P.; SILVA, T. N.; SILVA, V. H. P.; RODRIGUES, P. E.; CARREGARI, H. R.; ANJOS, I. A. **Censo varietal IAC de cana-de-açúcar no Brasil - Safra 2022/23**. Instituto agronômico, 2023.

CALHEIROS, A. S.; OLIVEIRA, M. W.; FERREIRA, V. M; BARBOSA, G. V. S.; SANTIAGO, A. D.; ARISTIDES, E. V. S. Production of biomass, from sugar and protein in function of sugarcane varieties and phosphorous fertilization. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 809-818, Abr. 2012. DOI. 10.5433/1679-0359.2012v33n2p809.

CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R. M.; FERREIRA, P. C.G.; HEMERLY A. S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p.5631–5642, 2014. DOI. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>.

CARVALHO, T. L. G. de; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Sugarcane genetic controls involved in the association with beneficial endophytic nitrogen fixing bacteria. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 31–41, Fev. 2011. DOI. 10.1007/s12042-011-9069-2.

CARVALHO, T. L. G.; ROSMAN, A. C.; GRATIVOL, C.; *et al.* Sugarcane genotypes with contrasting biological nitrogen fixation efficiencies differentially modulate nitrogen metabolism, auxin signaling, and microorganism perception pathways. **Plants**, v. 11, n. 15, p. 1-31, Jul. 2022. DOI. 10.3390/plants11151971.

CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; *et al.* Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. , p. 461-479, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, Dec. 2016. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440–459, Ago. 2014. DOI. 10.1007/s00344-013-9362-4.

CGM. *Azospirillum*, 2024. Disponível em: <https://gcm.wdcm.org/search?search=azospirillum>. Acesso em: 22 nov. 2024.

CIPRIANO, M. A. P.; FREITAS-IÓRIO, R. DE P.; DIMITROV, M. R.; *et al.* Plant-growth endophytic bacteria improve nutrient use efficiency and modulate foliar n-metabolites in sugarcane seedling. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 1–19, Fev. 2021. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030479>.

CNPTIA. Inoculantes, 2024. Disponível em: <https://www.atermaisdigital.cnptia.embrapa.br/web/inoculantes?q=Azospirillum+brasiliense>. Acesso em: 22 nov. 2024.

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, n. 2, p. 97–103, Out. 2008. DOI. 10.1007/s10725-007-9232-9.

CONAB. *Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2023/2024 - 4º levantamento*. v. 11, p. 1–52, Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento, 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 22 nov. 2024.

COSTA, M. S.; ROLIM, M. M.; SILVA, G. F.; SIMÕES NETO, D. E.; PEDROSA, E. M. R. Nutrient content and accumulation in sugarcane under mineral fertilization and high doses of vinasse. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, p. 565–582, Abr. 2021. DOI. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n2p565>.

DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A.; ZAMBOM, J. L. C.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BRASILEIRO, B. P.; WEBER, H.; IDO, O. T.; RUARO, L. *et al.* 2020. Programa de melhoramento genético da cana-de-açúcar: Relatório técnico 2012-2020.

DAY, J. M.; DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from Digitaria roots. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 1, p. 45–50, Jun. 1976. DOI. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(76\)90020-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(76)90020-1).

DE OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, R. I.; FREIRE, M. B. G. S.; SIMÕES NETO, D. E.; SILVA, S. A. M. Nutrient extraction and export by fully irrigated sugarcane varieties. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1343–1352, 2010. DOI. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832010000400031>.

DEEKEN, R.; GEIGER, D.; FROMM, J.; KOROLEVA, O.; ACHE, P.; LANGENFELD-HEYSER, R.; SAUER, N.; MAY, S. T.; HEDRICH, R. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of *Arabidopsis*. **Planta**, v. 216, p. 334–344, Set. 2002. DOI. <https://doi.org/10.1007/s00425-002-0895-1>.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; THYS, A.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, n. 2, p. 155–164, Mai. 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1004658000815>. Acesso em: 22 nov. 2024.

DÖBEREINER J., DAY J. M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Newton WE, Nyman CT, editors. Proceedings of the international symposium on nitrogen fixation. 2nd ed. Pullman: Washington State

University.

DOS SANTOS, S. G.; SILVA RIBEIRO, F.; ALVES, G. C.; SANTOS, L. A.; REIS, V. M. Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. **Plant and Soil**, v. 451, p. 25–44, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04101-1>.

DOS SANTOS, S. G.; CHAVES, V. A.; SILVA RIBEIRO, F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, Ago. 2019b. Doi. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.015>.

DUTTA, S.; PODILE, A. R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 232–244, Ago. 2010. DOI. 10.3109/10408411003766806.

ELMERICH C., AUBERT J. P. Synthesis of glutamate by a glutamine: 2-oxo-glutarate amidotransferase (NADP oxidoreductase) in *Bacillus megaterium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 42, n. 3, p. 371–376, Dec. 1971.

FADEL-PICHETH, C. M. T.; SOUZA, E. M.; RIGO, L. U.; *et al.* Regulation of *Azospirillum brasilense* nifA gene expression by ammonium and oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 179, n. 2, p. 281–288, Out. 1999. DOI. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08739.x>.

FAOSTAT. Production - Crops and livestock products, 2024. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 13 nov. 2024.

FERREIRA, N. S.; MATOS, G. F.; MENESES, C. H. S. G.; REIS, V. M.; ROUWS, J. R. C.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I.; ROUWS, L. F. M. Interaction of phytohormone-producing rhizobia with sugarcane mini-setts and their effect on plant development. **Plant and Soil**, v. 451, p. 221-238, Jan. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04388-0>.

FIGUEIREDO, G. G. O.; JOÑO, C. C.; ROMANO, T.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DAROS, E. Sugarcane clones inoculated with five species of promoting growth plant bacteria. **Idesia**, v. 35, n. 2, p. 71-77, Mai. 2017. DOI. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292017005000021>.

FORMANN, S.; HAHN, A.; JANKE, L.; STINNER, W.; STRÄUBER, H.; LOGROÑO, W.; NIKOLAUSZ, M. Beyond sugar and ethanol production: Value generation opportunities through sugarcane residues. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, 579577, Nov. 2020. DOI. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2020.579577>.

FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; FARONI, C. E.; *et al.* Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29–41, Feb. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.11.011>.

FU, H. A.; HARTMANN, A.; LOWERY, R. G.; *et al.* Posttranslational regulatory system for nitrogenase activity in *Azospirillum* spp. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 9, p. 4679–4685, Set. 1989. DOI. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.4679-4685.1989>.

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; NOGUEIRA, L. M.; LUDKIEWICZ, M. G. Z.; ANDREOTTI, M.; BELLOTTE, J. L. M. Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, v. 40, e0150364, Out. 2016. DOI. <https://doi.org/10.1590/18069657rbcS20150364>.

GARCIA, N. F. S.; ARF, O.; PORTUGAL, J. R.; *et al.* Doses and application methods of *Azospirillum brasilense* in irrigated upland rice. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 11, p. 990–995, nov. 2016. DOI. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n11p990-995>.

GAVA, G. J. de C.; SCARPARE, F. V.; CANTARELLA, H.; *et al.* Nitrogen source contribution in sugarcane-inoculated plants with diazotrophic bacteria under urea-N fertigation management. **SugarTech**, v. 21, n. 3, p. 462–470, Abr. 2019. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0614-2>.

GHENOV, F.; GERHARDT, E. C. M.; HUERGO, L. F.; *et al.* Characterization of glutamine synthetase from the ammonium-excreting strain HM053 of *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1–8, Jul. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.235927>.

GÍRIO, L. A. DA S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; *et al.* Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization effect on the initial growth of sugarcane from pre-sprouted seedlings. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 33–43, Jan. 2015. DOI. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100004>.

GÍRIO, L. A. S. da; DA SILVA, R. P.; DE MENEZES, P. C.; *et al.* Quality of multi-row harvesting in sugarcane plantations established from pre-sprouted seedlings and billets. **Industrial Crops and Products**, v. 142, Dec. 2019. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111831>.

GLOBALFERT. Outlook GlobalFert 2024. 2024. Disponível em: <https://globalfert.com.br/outlook-globalfert/>. Acesso em: 24. Nov. 2024.

GONÇALVES, M. C.; SILVA, K. C. DA; OLIVEIRA, C. E. DA S.; STEINER, F. Nitrogênio e *Azospirillum brasilense* no desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar. **Colloquium Agrariae**, v. 16, n. 2, p. 72–81, Mar. 2020. DOI. [10.5747/ca.2020.v16.n2.a360](https://doi.org/10.5747/ca.2020.v16.n2.a360).

HOUSH, A. B.; BENOIT, M.; WILDER, S. L.; *et al.* Plant-growth-promoting bacteria can impact zinc uptake in *Zea mays*: An examination of the mechanisms of action using functional mutants of *Azospirillum brasilense*. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, Mai. 2021b. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051002>.

HOUSH, A. B.; POWELL, G.; SCOTT, S.; *et al.* Functional mutants of *Azospirillum brasilense* elicit beneficial physiological and metabolic responses in *Zea mays* contributing to increased host iron assimilation. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 15, n. 5, p. 1505–1522, Jan. 2021a. DOI. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00866-x>.

HOUSH, A. B.; WALLER, S.; SOPKO, S.; *et al.* *Azospirillum brasilense* bacteria promotes Mn<sup>2+</sup> uptake in maize with benefits to leaf photosynthesis. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, Jun. 2022. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071290>.

HUERGO, L. F.; PEDROSA, F. O.; MULLER-SANTOS, M.; *et al.* PII signal transduction proteins: Pivotal players in post-translational control of nitrogenase activity. **Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 176–190, Jan. 2012. DOI. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049783-0>.

HUNGRIA, M.; BARBOSA, J. Z.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 114, n. 5, p. 2969–2980, Jun. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1002/agj2.21150>.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, Jan. 2010. DOI. [10.1007/s11104-009-0262-0](https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0).

JAOUDE, R. ABOU; LUZIATELLI, F.; FICCA, A. G.; RUZZI, M. A plant's perception of growth-promoting bacteria and their metabolites. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, n. Jan., p. 1–31, 2023. DOI. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1332864>.

KHAN, E. A.; AFTAB, S.; HASANUZZAMAN, M. Unraveling the importance of nitric oxide in plant-microbe interaction. **Plant Stress**, v. 10, p. 1-9. 2023. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100258>.

KORNDORFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; DUARTE, I. N.; PINTO, L. R. N.; FONSECA, L. F. Sugarcane cultivation with source potassium low water-soluble. **Acta Scientiarum**, v. 40, n. 1, e36399, 2018. DOI. <https://doi.org/10.4025/actasciagr.v40i1.36399>.

LANDELL, M. G. DE A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A. dos. *et al.* **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas**. Campinas: Instituto Agrônômico, n. 109, 2012.

LIRA, D. N. S.; ARAUCO, A. M. S.; BOECHAT, C. L.; MOITINHO, M. R.; LACERDA, J. J.; MARTINS, E. C. Associative diazotrophic bacteria inoculated in sugarcane cultivars: Implications on morphophysiological attributes and plant nutrition. **Revista Brasileira De Ciência Do Solo**, v. 44, e0190155, Jun. 2020. DOI. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20190155>.

LOPES, V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DE ARAUJO, L. M.; *et al.* The selection of sugarcane families that display better associations with plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 43–52, Jul. 2012. DOI. [10.3923/ja.2012.43.52](https://doi.org/10.3923/ja.2012.43.52).

LOPES, V. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; FIGUEIREDO, G. G. O.; OLIVEIRA, R. A. de; DAROS, E. Interaction between sugarcane families and plant growth-promoting bacteria in two crop cycles. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 2, p. 527–538, Abr. 2019. DOI. [10.5433/1679-0359.2019v40n2p527](https://doi.org/10.5433/1679-0359.2019v40n2p527).

LPSN. Genus: *Azospirillum*, 2024. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/azospirillum>. Acesso em: 22 nov. 2024.

MACHADO, H. B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L. U.; PEDROSA, F. O. Excretion of

ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549–553, Jul. 1991. DOI. <https://doi.org/10.1139/m91-092>.

MAHMOOD, A.; TURGAY, O. C.; FAROOQ, M.; HAYAT, R. Seed biopriming with plant growth promoting rhizobacteria: A review. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 8, fiw112, Mai. 2016. DOI. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw112>.

MARAFON, A. C. **Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: Uma introdução ao procedimento prático**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros v. 168, n. 29, Dez. 2012.

MARIN, F. R. Cana, 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pre-producao/caracteristicas/solo>>. Acesso em: 22 nov. 2024.

MARTIN, T. N.; FIPKE, M. G. M.; MÜLLER, T. M.; CECHIN, J.; FAÉ, G. S.; ARISMENDI, G. A. *Azospirillum brasilense*: Inoculation and nitrogen management on the development and yield of barley. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 55, n. 8, p. 1148-1158, Dec. 2024. DOI. <https://doi.org/10.1080/00103624.2023.2296541>.

MARTINS, A. P. L.; REISSMANN, C. B. Laboratory routine for chemical and analytical procedures on plant tissues. **Scientia Agraria**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2007.

MARSCHNER. P. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier. 3 ed. 2012, Australia.

MATOSO, E. S.; REIS, V. M.; GIACOMINI, S. J.; *et al.* Diazotrophic bacteria and substrates in the growth and nitrogen accumulation of sugarcane seedlings. **Scientia Agricola**, v. 78. n. 1, p. 1–9, Jul. 2021. DOI. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2019-0035>.

MAY, A.; RAMOS, N. P. **Uso de gemas individualizadas de cana-de-açúcar para a produção de mudas**. Circular Técnica 29, v. 1, n. 1, p. 1–19, 2019.

MAY, A.; SANTOS, M. DE S. DOS; SILVA, E. H. F. M. DA; *et al.* Effect of *Bacillus aryabhattai* on the initial establishment of pre-sprouted seedlings of sugarcane varieties. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1-9, 2021. DOI. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i2.12337>.

MEDEIROS, C.; ALMEIDA BALSALOBRE, T. W.; CARNEIRO, M. S. Molecular diversity and genetic structure of *Saccharum* complex accessions. **PLOS ONE**, v. 15, n. 5, p. 1–17, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233211>.

MEERS, J. L.; TEMPEST, D. W. Glutamine(amide) : 2-Oxoglutarate Amino Transferase Oxido-reductase (NADP) ', an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 64, p. 187-194, Dec. 1970. DOI. <https://doi.org/10.1099/00221287-64-2-187>.

MIRANDA, L. L. D.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. Cana-de-açúcar, Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 882p. 2008.

MOURA, J. B. A.; SOUZA, R. F.; VENTURA, M. V. A.; FURQUIM, L. C.; JUNIOR, W. G. V. Influence of nitrogen fixing bacteria in the establishment of pre-broken sugar cane. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Sciences**, v. 21, n. 1, p. 22–26, Jan. 2019. Disponível em:

[https://www.researchgate.net/publication/332819512\\_INFLUENCE\\_OF\\_NITROGEN\\_FIXING\\_BACTERIA\\_IN\\_THE\\_ESTABLISHMENT\\_OF\\_PRE-BROKEN\\_SUGAR\\_CANE](https://www.researchgate.net/publication/332819512_INFLUENCE_OF_NITROGEN_FIXING_BACTERIA_IN_THE_ESTABLISHMENT_OF_PRE-BROKEN_SUGAR_CANE).

Acesso em: 22 nov. 2024.

MOURE, V. R.; DANYAL, K.; YANG, Z. Y.; *et al.* The nitrogenase regulatory enzyme dinitrogenase reductase adpribosyltransferase (DraT) is activated by direct interaction with the signal transduction protein glb. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 279–286, Jan. 2013. DOI. <https://doi.org/10.1128/jb.01517-12>.

MOUTIA, J. F. Y.; SAUMTALLY, S.; SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Plant growth promotion by *Azospirillum* sp. in sugarcane is influenced by genotype and drought stress. **Plant and Soil**, v. 337, p. 233-242, Ago. 2010. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0519-7>.

NAKAO, A. H.; ANDREOTTI, M.; SOARES, D. de A.; MODESTO, V. C.; DICKMANN, L. Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, n. 3, p. 501–511, Set. 2018. DOI. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180057>.

NOGUEIRA, M. C. S. Orthogonal contrasts: definitions and concepts. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 1, p. 118–124, Fev. 2004. DOI. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162004000100020>.

OKON, Y.; HEYTLER, P. G.; HARDY, R. W. F. N<sub>2</sub> Fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 694–697, Set. 1983. DOI. 10.1128/aem.46.3.694-697.1983.

OLIVEIRA, M. S.; SANTOS, K. F. D. N.; DE PAULA, R. M.; *et al.* Nitric oxide detection using a chemical trap method for applications in bacterial systems. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, Ago. 2023. DOI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092210>.

OLIVEIRA, R. A.; BARBOSA, G. V. S.; DAROS, E. 50 anos de variedades RB de cana-de-açúcar: 30 anos de RIDESA, 2021. Curitiba: RIDESA.

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

OTTO, R.; CASTRO, S. A. Q.; MARIANO, E.; *et al.* Nitrogen use efficiency for sugarcane-biofuel production: What is next? **Bioenergy Research**, v. 9, n. 4, p. 1272–1289, jun. 2016. DOI. 10.1007/s12155-016-9763-x.

OTTO, R.; MACHADO, B. A.; MELO DA SILVA, A. C.; QUASSI DE CASTRO, S. G.; LISBOA, I. P. Sugarcane pre-sprouted seedlings: A novel method for sugarcane establishment. **Field Crops Research**, v. 275, Jan. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2021.108336>.

PAIVA, C. A. O.; GOMES, E. A.; SOUZA, S. M.; LANA, U. G. P.; SILVA, F. C.; FREIRE, F. J. Microrganismos promotores de crescimento vegetal em cana-de-açúcar e outras gramíneas. In: SILVA, F. C.; FREIRE, F. J. Inovação e desenvolvimento em cana-de-açúcar Manejo, nutrição, bioinsumos, recomendação de corretivos e fertilizantes. Brasília: Embrapa, 2024. p. 161-181.

PALUDO, F.; CHAVES, R. B. R.; WUSTRO, I. C.; BRASILEIRO, B. P.; OLIVEIRA, R. A. de.; BESPALHOK FILHO, J. C. Growth and nutritional content of pre-sprouted seedlings of five sugarcane cultivars inoculated with *Azospirillum brasilense* Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7, and HM053 strains. **Sugar Tech**, Dec. 2024. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-024-01525-7>.

PANKIEVICZ, V. C. S.; do AMARAL, F. P.; SANTOS, K. F. D. N.; *et al.* Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907–919, Mar. 2015. DOI. <https://doi.org/10.1111/tpj.12777>.

PAULETTI, V.; MOTTA, A. C. V. Manual de Adubação e Calagem para o Estado do Paraná. 2ª ed. 2019. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

PEDROSA, F. O.; OLIVEIRA, A. L. M.; GUIMARÃES, V. F.; *et al.* The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, p. 45-56, Jun. 2019. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>.

PEREG, L.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v. 399, p. 389–414, Dec. 2016. DOI. [10.1007/s11104-015-2778-9](https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9).

PEREIRA, W.; OLIVEIRA, R. P.; PEREIRA, A.; *et al.* Nitrogen acquisition and 15N-fertiliser recovery efficiency of sugarcane cultivar RB92579 inoculated with five diazotrophs. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 119, n. 1, p. 37–50, Nov. 2021. DOI. <https://doi.org/10.1007/s10705-020-10100-x>.

PERRIG, D.; BOIERO, M. L.; MASCIARELLI, O. A.; *et al.* Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–1150, Mar. 2007. DOI. [10.1007/s00253-007-0909-9](https://doi.org/10.1007/s00253-007-0909-9).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2023. Disponível em: <https://www.r-project.org/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

REED, L.; GLICK, B. R. The recent use of plant-growth-promoting bacteria to promote the growth of agricultural food crops. **Agriculture (Switzerland)**, v. 13, n. 5, p. 1–24, Mai. 2023. DOI. <https://doi.org/10.3390/agriculture13051089>.

REIS, G. V.; SIEBENEICHLER, S. C.; LAZZARETTI, B.; *et al.* Growth response of pre-sprouted seedlings of sugarcane in the presence of the bacterium *Herbaspirillum frisingense*. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v. 4, n. 5, p. 1387–1391, Out. 2019. DOI. <https://dx.doi.org/10.22161/ijeab.45.15>.

REYNDERS, L.; VLASSAK, K. Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 11, n. 5, p. 547–548, Feb. 1979.

- RIVERA, D.; MORA, V.; LOPEZ, G.; *et al.* New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 6, p. 1774–1785, Ago. 2018. DOI. 10.1111/jam.14080.
- ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; *et al.* Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PLOS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1-9, Abr. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019045>.
- ROSA, J. G. Grande sertão: veredas. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1956.
- ROSSETTO, L.; PIERANGELI, G. M. F.; KURAMAE, E. E.; *et al.* Sugarcane pre-sprouted seedlings produced with beneficial bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. **Bragantia**, v. 80, Dec. 2021. DOI. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20200276>.
- SAHOO, G.; SWAMY, S. L.; SUNGH, A. K.; MISHRA, A. Propagation of *Pongamia pinnata* (L.) Pierre: Effect of auxins, age, season and C/N ratio on rooting of stem cuttings. **Trees Forests and People**, v. 5, 100091, Abr. 2021. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2021.100091>.
- SANTOS, A. R. S.; ETTO, R. M.; FURMAM, R. W.; *et al.* Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422–426, Set. 2017a. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.003>.
- SANTOS, K. F. D. N.; MOURE, V. R.; HAUER, V.; *et al.* Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1–2, p. 245–255, Dec. 2017b. DOI. 10.1007/s11104-016-3140-6.
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, p. 1–31, Nov. 2021. DOI. <https://doi.org/10.36783/18069657rbc20200128>.
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, 205, 2019a. DOI. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.
- SANTOS, S. G. dos; DA SILVA RIBEIRO, F.; ALVES, G. C.; SANTOS, L. A.; REIS, V. M. Inoculation with five diazotrophs alters nitrogen metabolism during the initial growth of sugarcane varieties with contrasting responses to added nitrogen. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1–2, p. 25–44, Mai. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04101-1>.
- SCHULTZ, N., REIS, V. M., URQUIAGA, S. **Resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada: fontes nitrogenadas, formas de aplicação, épocas de aplicação e efeito varietal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2015.
- SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SILVA P. A.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; ALVES, B.

- J. R.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 366-374, 2017. DOI. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2017.1374869>.
- SCOTT, S.; HOUSH, A.; POWELL, G.; *et al.* Crop yield, ferritin and Fe ( II ) boosted by *Azospirillum brasilense* (HM053) in corn. **Agronomy**, v. 10, n. 3, p. 394, Mar. 2020. DOI. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030394>.
- SCUDELETTI, D.; CRUSCIOL, C. A. C.; MOMESSO, L.; *et al.* Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential. **European Journal of Agronomy**, v. 144, Mar. 2023. DOI. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126749>.
- SILVA, F. C.; LUCHIARI JÚNIOR, A.; FREITAS, P. L.; PEREIRA, W.; COLETI, J. T.; RODRIGUES, G. C.; CARVALHO, M. L.; CHISTOFOLETI, D. Produção, plantio e condução de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. *In*: SILVA, F. C.; FREIRE, F. J. **Inovação e desenvolvimento em cana-de-açúcar Manejo, nutrição, bioinsumos, recomendação de corretivos e fertilizantes**. Brasília: Embrapa, 2024. p. 161-181.
- SOUZA, F. G. de; ALVAREZ, R. DE C. F.; TEODORO, L. P. R.; *et al.* Planting arrangement and seedling type influence yield and quality of ratoon sugarcane? **Sugar Tech**, v. 24, n. 5, p. 1590–1596, Fev. 2022. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-021-01086-z>.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419, Dec. 2015. DOI. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>.
- SPIRONELLO, A.; RAIJ, B.; PENATTI, C. P.; CANTARELLA, H.; MORELLI, J. L. M.; ORLANDO FILHO, J.; LANDELL, M. G. A.; ROSSETTO, R. Sugarcane crop. *In*: VAN RAIJ, B.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**, 2nd ed. Campinas: Instituto Agronômico, 1997.
- STOLF, R.; LEE, T.S. G. Sistema comercial de plantio de plântulas de cultura de tecidos ou de gemas isoladas: plantio de estaca. **Alcool e Açúcar**, v.10, n.53, p.20-5, Jun. 1990.
- TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBERAINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus. **Canadian Journal of Microbiology**, , n. 1976, Abr. 1978.
- TEDESCO M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solo, planta e outros materiais. 2a Edição Revidada e Ampliada. Porto Alegre, 1995.
- TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, Mai. 1979. DOI. [10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979](https://doi.org/10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979).

TIMOFEEVA, A. M.; GALYAMOVA, M. R.; SEDYKH, S. E. Plant growth-promoting soil bacteria: Nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities. **Plants**, v. 12, n. 24, Dec. 2023. DOI. <https://doi.org/10.3390/plants12244074>.

TOMKINS, J. P.; YU, Y.; MILLER-SMITH, H.; *et al.* A bacterial artificial chromosome library for sugarcane. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 3–4, p. 419–424, Ago. 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s001220051252>. Acesso em: 22 nov. 2024.

UNICA. 2024. Labor conditions. Disponível em: <https://www.sugarcane.org/sustainability-the-brazilian-experience/labor-conditions/>. Acesso em: 24 jul. 2024.

UNICA. Setor sucroenergético – açúcar, 2024a. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/acucar/>. Acesso em: 13 nov. 2024.

UNICA. Setor sucroenergético – outros produtos, 2024b. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/outros-produtos/>. Acesso em: 13 nov. 2024.

UNICA. UnicaData – fotografia do setor, 2024c. Disponível em: <https://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=158>. Acessado em: 13 nov. 2024.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; DE MORAIS, R. F.; *et al.* Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, Out. 2012. DOI. 10.1007/s11104-011-1016-3.

VIANA, R. S.; MOREIRA, B. R. de A.; LISBOA, L. A. M.; SANDU JUNIOR, R.; *et al.* Morphological changes in sugarcane crop induced by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Sugar Tech**, v. 22, n. 2, p. 241-249, Abr. 2020. DOI. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00773-2>.

VIATOR, R. P.; NUTI, R.; WELLS, R.; EDMISTEN, K. Stem and root carbohydrate dynamics in modern vs. obsolete cotton cultivars. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 36, p. 2165–2177, Set. 2005. DOI. <https://doi.org/10.1080/00103620500196366>.

VON BÜLOW, J. F. W.; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. **Agricultural Sciences**, v. 72, n. 6, p. 2389-2393, Jun. 1975. DOI. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2389>.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; *et al.* *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 12, Dec. 2011. DOI. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>.

XAVIER, M. A.; LANDELL, M. G. A.; PIRES, R. C. M.; ROSSETTO, R.; DINARDO-MIRANDA, L. L.; PERECIN, D. *et al.* Gemas brotadas de cana-de-açúcar: produção sustentável e utilização experimental na formação de áreas de multiplicação. n. 115, 2020. Campinas: Instituto Agrônômico.

## 7 APÊNDICE A – PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MUDAS PRÉ-BROTADAS



Mini toletes com  
uma gema,  
acomodados em  
bandeja com  
substrato comercial



Brotação das gemas  
em ambiente  
controlado



Desenvolvimento do  
broto



Muda aos 50 DAI