



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



LUANA CAROLINA GOMES JONCK

**Interferência de herbicidas na associação da bactéria
diazotrófica *Nitrospirillum amazonense* e mudas pré-brotadas de
cana-de-açúcar**

ARARAS - 2021



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



LUANA CAROLINA GOMES JONCK

**Interferência de herbicidas na associação da bactéria
diazotrófica *Nitrospirillum amazonense* e mudas pré-brotadas de
cana-de-açúcar**

Monografia apresentada ao Curso de
Engenharia Agrônoma – CCA – UFSCar para
a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Andrea
Monquero

ARARAS – 2021

Dedico este trabalho à minha mãe Francineide, a qual foi minha maior incentivadora na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tamanho amor e misericórdia. Por estar comigo em todos os momentos e ter me capacitado a realizar esse trabalho. “Ao único Deus, sábio, seja dada glória por Jesus Cristo para todo o sempre. Amém” – Romanos 16:27.

À minha mãe Francineide, por ter sido a minha maior incentivadora. Obrigado por ter sonhado este sonho comigo e não ter medido esforços para que eu pudesse realizá-lo.

Ao meu pai Almir, por todo o amor, proteção e apoio.

Às minhas irmãs Leticia e Ana Lara, por nossa união. Vocês são a força e alegria da minha vida.

À Professora Patrícia Andrea Monquero pela orientação, apoio e paciência durante todos os anos da minha graduação. Sou imensamente grata por todas as oportunidades e conhecimentos adquiridos. Foi uma enorme honra ser orientada por uma profissional a qual admiro tanto.

À Professora Márcia Maria Rosa Magri, por toda dedicação, apoio e auxílio para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Gustavo Roesler, pelo companheirismo durante todos esses anos de graduação. Obrigado por ter me apoiado e estado ao meu lado em todos os momentos. Serei eternamente grata pela sua amizade.

Aos meus amigos Sara Santos, Raquel Tessitore e Daniel Desiderio por terem feito minha graduação mais feliz.

À todos os integrantes do Grupo de Estudos em Ciências Agrárias (GECA/UFSCar), por todos os conhecimentos compartilhados, auxílio e companheirismo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro a realização deste trabalho (Processo 2020/03715-4).

“Confie no Senhor de todo o seu coração e não se apoie em seu próprio entendimento; reconheça o Senhor em todos os seus caminhos, e ele endireitará as suas veredas.”

Provérbios 3: 5-6

RESUMO

O inoculante microbiano para cana-de-açúcar contendo células de *Nitrospirillum amazonense* é uma tecnologia recente e tem sido adotada associada a mudas pré-brotadas para aumentar de forma sustentável a produtividade da cultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade da bactéria *Nitrospirillum amazonense* aos herbicidas imazapic e indaziflam assim como o impacto dessa inoculação e tratamentos herbicidas em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. A sensibilidade “*in vitro*” da bactéria *N. amazonense* aos herbicidas foi avaliada por meio da técnica de concentração mínima inibitória (Ensaio 1). Neste ensaio foram avaliados 2 herbicidas (imazapic - 200 g i.a. ha⁻¹ e indaziflam - 100 g i.a. ha⁻¹) em 5 doses. No segundo ensaio foi avaliada a sensibilidade de *N. amazonense* aos herbicidas imazapic e indaziflam, aplicados na dose comercial, em solo autoclavado. A contagem da população bacteriana foi realizada através da técnica do número mais provável (Tabela de McCrady). No ensaio 3 foram avaliados tratamentos herbicidas (indaziflam, imazapic, clomazone, tebuthiuron, sulfentrazone, sem herbicida), aplicados em pré-plantio de mudas pré-brotadas da variedade RB 966928, na presença e ausência do inoculante *N. amazonense*. De acordo com os resultados dos ensaios a presença do indaziflam não interferiu no crescimento *in vitro* da bactéria *N. amazonense*, independentemente da dose. O imazapic ocasionou inibição significativa no crescimento da bactéria apenas na dose 2DC. A contagem da bactéria *N. amazonense* no solo dos tratamentos que receberam a aplicação de indaziflam e imazapic, não diferiu em relação ao solo sem herbicida. As mudas pré-brotadas da variedade RB966928 apresentaram alta sensibilidade ao herbicida imazapic, independentemente da inoculação de *N. amazonense*. Os herbicidas clomazone, tebuthiuron e sulfentrazone não interferiram no efeito promotor de crescimento de *N. amazonense*. A inoculação não resultou em alteração da sensibilidade das mudas pré-brotadas aos herbicidas. Conclui-se que os herbicidas avaliados neste estudo não interferem na associação de mudas pré-brotadas da variedade RB966928 com a bactéria *N. amazonense*, embora a seletividade para as mudas seja diferencial entre os herbicidas.

Palavras-chave: bactérias promotoras de crescimento; herbicidas; intoxicação; mudas pré-brotadas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Absorbância de *Nitrospirillum amazonense* em meio contendo diferentes doses dos herbicidas imazapic e indaziflam..... **27**

Figura 2. Crescimento de *Nitrospirillum amazonense* em meio semisólido LGI **28**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise química de amostras de solo utilizadas no experimento	21
Tabela 2. Composição do meio LGI.....	22
Tabela 3. Log ¹⁰ do número mais provável de UFC de <i>N. amazonense</i> por grama de solo.....	29
Tabela 4. Porcentagem de Fitotoxicidade de herbicidas aplicados em pré-plantio de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 com e sem a inoculação de <i>N. amazonense</i>	33
Tabela 5. Altura, área foliar e biomassa da parte aérea de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 com e sem a inoculação de <i>N. amazonense</i>	35
Tabela 6. Comprimento da raiz e biomassa seca da raiz de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 com e sem inoculação de <i>N. amazonense</i>	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A cultura da cana-de-açúcar	12
2.2 Mudanças pré-brotadas (MPB)	12
2.3 Exigência nutricional da cana-de-açúcar	13
2.4 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)	14
2.5 Bactérias promotoras de crescimento (BPC)	14
2.6 Inoculante microbiana para cultura da cana-de-açúcar	15
2.7 Plantas daninhas em canaviais	16
2.8 Bactérias promotoras de crescimento (BPC) x herbicidas	16
2.9 Mudanças pré-brotadas (MPB) x Inoculação com BPC	18
3. HIPÓTESES	19
4. OBJETIVOS	19
5. MATERIAIS E METODOS	20
5.1 Ensaio <i>in vitro</i> de compatibilidade de herbicidas com a bactéria <i>N. amazonense</i>	20
5.1.1 Avaliação da Concentração Mínima Inibitória	20
5.1.2 Avaliação da resistência de <i>N. amazonense</i> à aplicação de herbicidas no solo	21
5.2 Sensibilidade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> à aplicação de herbicidas	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1 Compatibilidade <i>in vitro</i> entre os herbicidas imazapic e indaziflam e a bactéria diazotrófica <i>N. amazonense</i>	25
6.2 Sensibilidade de <i>N. amazonense</i> a herbicidas aplicados ao solo	27
6.3 Sensibilidade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com <i>N. amazonense</i> à aplicação de herbicidas	30
7. CONCLUSÃO	38
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Devido à necessidade de suprir a crescente demanda do setor sucroenergético, é fundamental a busca por novas tecnologias de produção de cana-de-açúcar, que visem o aumento da produtividade e qualidade da matéria-prima. Desta forma, dentre as inovações tecnológicas empregadas no setor, tem-se o sistema de multiplicação através de mudas pré-brotadas (MPB), e a utilização de inoculantes a base de bactérias promotoras de crescimento (GARCIA, 2016; PEREIRA et al., 2013).

A tecnologia MPB se refere ao sistema de multiplicação que utiliza para implantação da lavoura mudas previamente tratadas, que conferem elevada qualidade fitossanitária ao canavial, alto padrão clonal, homogeneidade e vigor, além da redução do volume de material vegetal utilizado no plantio (VENTURA, 2017).

Por outro lado, as bactérias promotoras de crescimento (BPC) consistem em um grupo de microrganismos, que possuem a capacidade de associar-se às plantas e estimular o crescimento vegetal (OLIVEIRA, 2003). Os mecanismos utilizados pelas BPC diferem entre as espécies, podendo beneficiar o crescimento vegetal de forma direta, através da produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e fixação biológica de nitrogênio, ou de forma indireta a partir da produção de sideróforos, e da indução de resistência sistêmica a patógenos (COSTA, 2014). As BPC, através da produção de fitormônios, possuem a capacidade de promover aumento na velocidade de brotação das gemas de plantas associadas, assim como o estabelecimento rápido de raízes laterais e adventícias, o que resulta na exploração de um maior volume de solo, e conseqüentemente melhor absorção de água e nutrientes (LOPES, 2013).

A cana-de-açúcar possui a capacidade de associar-se com um grande número de espécies de bactérias promotoras de crescimento. Desta forma, a inoculação destes microrganismos na cultura, tem-se tornado uma alternativa viável ao setor sucroenergético para incrementar a produtividade e qualidade da matéria-prima de forma sustentável, com redução de custos e diminuição dos impactos ambientais (FERREIRA, 2018). Os estudos aplicados na área resultaram no desenvolvimento de um inoculante microbiológico líquido, específico para o cultivo da cana-de-açúcar, a partir da bactéria *Nitrospirillum amazonense*. O produto pode gerar ganhos de produtividade na cana-de-açúcar em até 18% (EMBRAPA, 2018).

Nitrospirillum amazonense é uma rizobactéria fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento vegetal (MATOSO, 2020). A espécie através da produção

de fitohormônios indutores de crescimento, estimula a rápida brotação de gemas e o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares, aumentando a eficiência de absorção das plantas a elas associadas (COSTA, 2016).

A presença de agroquímicos pode comprometer a eficiência da atuação das BPC, visto que o contato com estas moléculas pode ocasionar danos específicos às células bacterianas, como inibição da síntese de proteínas, alterações no DNA, e destruição oxidativa das membranas, causando efeitos bactericidas, bacteriostáticos ou mesmo prejudicando a eficácia da fixação biológica do nitrogênio desses microorganismos (LINO 2018; PROCÓPIO et. al., 2013).

Estudos com diversos herbicidas comumente utilizados na cultura da cana-de-açúcar tem demonstrado efeito tóxico destes produtos sobre o desenvolvimento de BPC, como isoxaflutole (SILVA et al., 2014), paraquat, amicarbazone, clomazone (PROCÓPIO et al., 2013), imazapyr, ametryne e oxyfluorfen (PROCÓPIO et al., 2014), diuron, metribuzin, e 2,4-D (PROCÓPIO et al., 2013).

Em contraposição, Pies et al. (2017), observaram efeitos benéficos da aplicação dos herbicidas diuron, imazapic e clomazone no desenvolvimento da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica*, onde estes herbicidas atuaram de modo a estimular o desenvolvimento deste microrganismo, o que pode ser explicado pela capacidade de algumas bactérias em degradar as moléculas de herbicidas, utilizando o composto químico destes como fonte de energia e carbono.

Das e Debnath (2006) também relataram efeitos estimulantes de herbicidas em microrganismos diazotróficos, à medida que a presença do herbicida oxyfluorfen ocasionou aumento da atividade microbiana, resultando em uma maior fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização de fosfato por estes microrganismos.

Por serem transplantadas no solo com sistema radicular formado, as mudas pré-brotadas são mais sensíveis aos resíduos presentes no solo, podendo ocorrer intoxicação por herbicidas aplicados em pré e pós-plantio (SILVA, 2018). A inoculação de BPC, por estimular o rápido crescimento de raízes laterais e adventícias, pode aumentar a sensibilidade destas mudas a fitointoxicação por herbicidas presentes no solo.

Deste modo, são necessários estudos acerca da compatibilidade de herbicidas a BPC que se associam a cultura da cana-de-açúcar, assim como a interferência destes herbicidas na sensibilidade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com estes microrganismos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) do mundo, apresentando área cultivada que ultrapassa 8,4 milhões de hectares. A produção total estimada para safra de 2021/22 é de 628 milhões de toneladas, com produtividade média de 74,576 kg/ha. Dentre os estados da federação, destacam-se São Paulo e Goiás respectivamente, como os maiores produtores nacionais (CONAB, 2021).

A cana-de-açúcar exerce importante papel na economia brasileira, sendo matéria prima destinada à indústria sucroalcooleira. São esperados a partir da safra 2021/2022 a produção de cerca de 27 bilhões de litros etanol e 38,9 milhões de toneladas de açúcar. Além da produção de etanol e açúcar, seus resíduos são empregados na geração de bioenergia. A eletricidade proveniente da biomassa da cana-de-açúcar é a quarta maior fonte da matriz elétrica do país, representando mais de 80 % de toda a geração de energia elétrica obtida a partir de biomassa no país (CONAB, 2021.; UNICA, 2021).

Devido à necessidade de suprir a crescente demanda do setor sucoenergético, é fundamental a busca por novas tecnologias de produção, que visem o aumento da produtividade e qualidade da matéria-prima. Desta forma, dentre as inovações tecnológicas empregadas no setor, tem-se o sistema de multiplicação através de mudas pré-brotadas, e a utilização de inoculantes a base de bactérias promotoras de crescimento (GARCIA, 2016; PEREIRA et al., 2013).

2.2 Mudanças pré-brotadas

O sistema de multiplicação via mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (MPB), consiste em uma tecnologia desenvolvida pelo instituto agrônomo de Campinas - IAC, onde são utilizadas para instalação do canavial, mudas previamente tratadas em lugar do plantio convencional por estruturas propagativas (LANDELL et al., 2012).

Dentre as vantagens da utilização de MPB's de cana-de-açúcar tem-se: maior qualidade fitossanitária do canavial, visto que as mudas transplantadas são previamente tratadas com fungicidas e inseticidas, diminuindo desta forma a

disseminação de pragas e doenças, maior uniformidade de plantio e vigor das plantas, vide a disposição espacial das mudas que favorece o melhor aproveitamento dos recursos hídricos e nutricionais, reduzindo a competição intraespecífica, além da redução do volume de matéria prima para instalação do canavial, gerando aumento de lucratividade ao produtor (DIAS, 2014.; LANDELL et al., 2012).

2.3 Exigência nutricional da cana-de-açúcar

Além dos cuidados com o plantio, o máximo potencial produtivo da cana-de-açúcar pode ainda ser limitado por diversos fatores bióticos e abióticos, entre os quais destacam-se a deficiência nutricional e a interferência de plantas daninhas (GALON, 2012).

A cana-de-açúcar possui elevado potencial de extração de nutrientes, especialmente no que se refere ao nitrogênio, sendo este um elemento essencial para o desenvolvimento da cultura. O nitrogênio nas plantas é constituinte obrigatório de aminoácidos, proteínas, enzimas, fitormônios, ácidos nucleicos, membranas, e metabólitos secundários, além de participar direta ou indiretamente de diversos processos como a fotossíntese e o crescimento celular (FERREIRA, 2017.; GIRÍO, 2014). De acordo com estudos realizados por Oliveira et al., (2010), a extração de nitrogênio pela cultura da cana-de-açúcar pode chegar até 179 kg/ha, onde aproximadamente 60 a 90% do total de nutrientes extraídos pela cultura, são mobilizados pelos produtos da colheita (SALVIANO et al. 2017).

Entretanto, embora a exigência nutricional da cana-de-açúcar por nitrogênio seja alta, a aplicação de grandes doses de fertilizantes minerais nitrogenados não resulta em elevadas taxas de retenção pelas plantas, à medida que cerca de 40% de todo nitrogênio aplicado a cultura é perdido por uma série de transformações químicas e microbianas (NETO, 2019).

Ainda, a cana-de-açúcar apresenta baixa resposta à adubação nitrogenada, principalmente no que diz respeito a cana-planta. Dentre os fatores relacionados a esta baixa resposta, tem-se a lixiviação de fertilizantes, a presença de sistema radicular mais vigoroso quando em comparação com a cana-soca, e a fixação biológica de nitrogênio por microrganismos diazotróficos (FRANCO, 2008.; OLIVER, 2014).

A cana-de-açúcar é uma espécie gramínea, que possui como característica a capacidade de associar-se com grande número de microrganismos, sendo resultantes destas associações diversos efeitos benéficos à cultura. Desta forma, a utilização de inoculantes com bactérias promotoras de crescimento, se apresenta como uma alternativa viável para melhorar o aproveitamento da adubação nitrogenada, reduzir a utilização de fertilizantes minerais, e promover ganhos de produtividade, sem comprometer o balanço energético da cultura (PEREIRA et al., 2013).

2.4 Fixação biológica de Nitrogênio

No que diz respeito à fixação biológica de nitrogênio, este é um processo no qual ocorre a reação de redução do N-atmosférico, através da atuação de um especializado grupo de organismos procariotos chamados diazotróficos, os quais possuem a enzima nitrogenase. O complexo enzima nitrogenase sob condições de temperatura, ambiente e pressão normal é capaz de realizar o rompimento da tríplice ligação do N_2 , reduzindo-o a NH_3 , sendo esta uma forma inorgânica de nitrogênio passível de assimilação pelas plantas (SCUDELETTI, 2016).

A contribuição média da fixação biológica de nitrogênio para a cana-de-açúcar é de 60% do requerido pela cultura (CASSETARI, 2015). Urquiaga et al. (2012), observaram contribuições de 40 a 64 kg ha⁻¹ de nitrogênio, proveniente da fixação biológica, quando foram avaliadas diferentes cultivares de cana-de-açúcar.

O N proveniente da fixação biológica pode substituir parcialmente a adubação mineral nitrogenada na cana-de-açúcar, sendo à inoculação de bactérias diazotróficas capaz de gerar redução da utilização de 150.000 toneladas de N-fertilizante por ano, correspondendo a economia de 735 milhões de reais (FERREIRA, 2017).

2.5 Bactérias promotoras de crescimento (BPC)

Bactérias promotoras de crescimento (BPC) podem beneficiar as culturas agrícolas direta ou indiretamente. Ação direta destes microrganismos, se dá através de diversos mecanismos, tais como a produção de fitormônios indutores de crescimento, como o ácido indol acético, etileno, citocininas e giberelinas, ou com a

atuação de modo a facilitar a absorção de nutrientes pela planta, como a solubilização de fósforo, e a fixação biológica de nitrogênio. Já a atuação indireta, compreende a ação destes microrganismos na indução de resistência sistêmica da planta a patógenos, pela produção de ácido cianídrico, sideróforos, antibiose, chitinases e glucanases que podem lisar células bacterianas, além de incrementar o teor de C orgânico do solo (CAMPOS, 2010; REIS, 2007).

As BPC, através da produção de fitormônios, possuem a capacidade de promover às plantas associadas a elas, um aumento na velocidade de brotação das gemas, e o estabelecimento rápido de raízes laterais e adventícias, desta forma permitindo que esta, explore um maior volume de solo, aumentando por consequência a absorção de água e nutrientes (LOPES, 2013).

Em trabalho de Chaves et al., (2015) foram encontrados aumento significativo da brotação das gemas, e da massa seca da parte aérea da cana-de-açúcar da variedade IACSP95-5000 quando foram inoculadas as bactérias promotoras de crescimento *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, e *Herbaspirillum Seropedicae*. Gírio et al., (2015), também observaram efeitos fisiológicos benéficos quando houve a inoculação de uma mistura com cinco estirpes de BPC na formação de mudas pré-brotadas da cultivar RB867515, onde foram observados aumento do perfilhamento, altura, diâmetro e produção das matérias secas de colmos e palha, além de incremento no comprimento radicular das plantas inoculadas.

2.6 Inoculante microbiano para cana-de-açúcar

No Brasil os estudos direcionados ao desenvolvimento de um inoculante específico para cana-de-açúcar se iniciaram em 1982 por pesquisadores da Embrapa Agrobiologia, onde foram realizadas pesquisas criteriosas com diversas estirpes de bactérias obtidas de plantas nativas da Amazônia, de cereais e da própria cana-de-açúcar (FERREIRA, 2017). Os estudos aplicados na área resultaram no desenvolvimento de um inoculante microbiológico líquido, específico para o cultivo da cana-de-açúcar, a partir da bactéria *Nitrospirillum amazonense*.

Nitrospirillum amazonense, anteriormente classificada como *Azospirillum amazonense*, é uma bactéria fixadora de nitrogênio e promotora de crescimento vegetal (MATOSO, 2020). A espécie através da produção de fitohormônios indutores

de crescimento, principalmente pela excreção do ácido indolacético, estimula a rápida brotação de gemas e o desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares aumentando a eficiência de absorção das plantas a elas associadas (COSTA, 2016).

O inoculante foi lançado ao mercado no ano de 2018, em parceria da Embrapa Agrobiologia e a empresa privada Basf, com nome comercial de Aprinza. De acordo com estudos realizados pelos pesquisadores responsáveis o produto pode gerar ganhos de produtividade na cana-de-açúcar em até 18% (EMBRAPA, 2018).

2.7 Plantas daninhas em canaviais

A presença de plantas daninhas em lavouras de cana-de-açúcar pode ser vista como um dos principais fatores bióticos que interferem no desenvolvimento da cultura. O convívio com plantas infestantes pode provocar perdas significativas de produtividade de colmo e de açúcar, decréscimo da longevidade do canavial, dificultar e encarecer a operação de colheita e ocasionar diminuição da qualidade industrial da matéria-prima (PROCÓPIO et. al., 2014).

De forma a minimizar as perdas de produtividade, dentre os métodos de controle de plantas daninhas existentes o mais empregado no país é o controle químico, devido à maior eficiência, maior rendimento operacional e menor custo por área plantada, quando comparado aos demais métodos (SILVA et. al., 2019).

A presença de plantas daninhas nos canaviais, gera a necessidade de longos períodos de utilização de herbicidas pré-emergentes, podendo estes limitar a utilização de inoculantes bacterianos por ocasionar efeitos negativos na atividade das BPC (PIES, 2017).

2.8 Bactérias promotoras de crescimento (BPC) x herbicidas

As interações entre as bactérias e plantas podem ser afetadas por diversos fatores, desde características inerentes às próprias plantas, como no ambiente em si, a exemplo de alterações nos genótipos da planta, presença de outros microrganismos e aplicação de inseticidas, herbicidas, cupinicidas e fungicidas (SILVA et al., 2012).

A presença de agroquímicos pode comprometer a eficiência da atuação das BPC, visto que o contato com estas moléculas pode ocasionar danos específicos às

células bacterianas, como inibição da síntese de proteínas, alterações no DNA, e destruição oxidativa das membranas, causando efeitos bactericidas, bacteriostáticos ou mesmo prejudicando a eficácia da fixação biológica do nitrogênio desses microorganismos (LINO 2018; PROCÓPIO et. al., 2013).

Em condições de estresse, a energia disponível aos microrganismos para manter seus processos celulares e bioquímicos, são direcionadas para ativação de mecanismos de tolerância ao estressor, ocasionando deste modo a redução do coeficiente de rendimento microbiano, pela limitação de crescimento, redução da capacidade de suporte e diminuição na eficiência do uso de recursos do meio (LINO, 2018).

Em trabalho de Procópio et al. (2011), pode ser observado que a presença de trifloxysulfuron-sodium+ametryn e glyphosate ocasionou redução na velocidade de crescimento da bactéria diazotrófica *A. brasilense*, à medida que os herbicidas paraquat e amicarbazone também afetaram negativamente a FBN dessa bactéria. Schwerz et al. (2017), também observaram efeitos negativos na fixação biológica de nitrogênio de *Nitrospirillum amazonense* (anteriormente classificada como *Azospirillum amazonense*), quando em contato com o herbicida sulfentrazone, de modo que foi visualizado aumento do efeito de limitação do crescimento da bactéria, quanto maior a dose aplicada do herbicida.

De forma similar, são encontrados na literatura efeitos tóxicos de diversos herbicidas comumente utilizados na cultura da cana-de-açúcar para a microbiota do solo, como clomazone (PETERS, 2011), isoxaflutole (SILVA et al., 2014), paraquat (SANTOS et al., 2006), diuron, metribuzin, e 2,4-D (PROCÓPIO et al., 2013).

Em contraposição, PIES et al., (2017), observaram efeitos benéficos a aplicação dos herbicidas diuron, imazapic e clomazone no desenvolvimento da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica*, onde estes herbicidas atuaram de modo a estimular o desenvolvimento destes microrganismos, fato que pode ser explicado pela capacidade de algumas bactérias em degradar as moléculas de herbicidas, utilizando o composto químico destes como fonte de energia e carbono. Em trabalho de Das e Debnath (2006), também foram encontrados efeito estimulante de herbicidas em microrganismos diazotróficos, à medida que a presença do herbicida oxyfluorfen, ocasionou aumento da atividade microbiana, resultando em uma maior fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização de fosfato por estes microrganismos.

2.9 Mudas pré-brotadas x Inoculação com BPC

Além da preocupação com o efeito tóxico de herbicidas sobre as bactérias promotoras de crescimento, há também a possibilidade de intoxicação das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar aos herbicidas registrados como seletivos para cultura em sistema de plantio convencional por estruturas propagativas. As MPB's são transplantadas ao solo com sistema radicular já desenvolvido, sendo desta forma mais sensível aos resíduos presentes no solo, podendo ocorrer a absorção de herbicidas residuais, ocasionando a fitointoxicação das plantas (DIAS, 2014). A inoculação com BPC, pode ainda estimular o rápido crescimento das raízes, podendo aumentar a absorção de herbicidas e elevar a fitotoxicidade deste pela cultura.

Visto que a utilização de inoculantes a base de bactérias promotoras de crescimento e a utilização de mudas pré-brotadas, são tecnologias recentes, há a carência de estudos acerca da compatibilidade de herbicidas na atividade destes microrganismos, e da interferência destes na sensibilidade de MPB's de cana-de-açúcar inoculadas com BPC.

3. HIPÓTESES

A aplicação dos herbicidas imazapic e indaziflam pode afetar a viabilidade da rhizobactéria *N. amazonense* (bactéria presente no produto comercial Aprinza-BASF) e comprometer seu efeito de promotor de crescimento em plantas de cana-de-açúcar.

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento pode ocasionar maior desenvolvimento do sistema radicular das mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar, aumentando a absorção de herbicidas aplicados ao solo, elevando a sensibilidade das mudas a fitointoxicação por estes herbicidas.

4. OBJETIVOS

a) Avaliar a compatibilidade entre herbicidas (imazapic e indaziflam), e a bactéria *N. amazonense*, em experimentos *in vitro* (meio de cultura) e através da aplicação em solo estéril.

b) Avaliar a sensibilidade de mudas pré-brotadas inoculadas com Aprinza à aplicação dos herbicidas clomazone, imazapic, tebuthiuron, indaziflam e sulfentrazone.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Ensaio *in vitro* de compatibilidade de herbicidas com a bactéria *Nitrospirillum amazonense*

5.1.1 Avaliação da Concentração Mínima Inibitória

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, Araras, SP. Para os testes, foi utilizada a estirpe de *Nitrospirillum amazonense* (BR 11145) obtida da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia.

As células da bactéria *N. amazonense* foram ativadas e multiplicadas em 200 mL de caldo nutriente (CN), cuja formulação, em g/L de água destilada consiste em: 1,0; extrato de carne; 2,0; extrato de levedura; 5,0; Peptona; 5,0; Cloreto de Sódio. A cultura foi incubada em shaker (30° C, 150 rpm), até turvação do meio, atingindo densidade óptica (DO_{600nm}) de aproximadamente 0,8.

Foram utilizados dois herbicidas registrados para a cana-de-açúcar, o imazapic (Plateau®) e o indaziflam (Alion®) nas doses 200 g i.a. ha⁻¹ e 100 g i.a. ha⁻¹, respectivamente. Ambos os herbicidas foram testados na dose comercial (DC), dobro (2DC), um e meio da dose comercial (1,5 DC), metade (½DC) e um quarto (1/4DC) e tratamento controle, sendo cada dose considerada um tratamento. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 x 5, sendo dois herbicidas e cinco doses, com três repetições.

A metodologia adotada para avaliar a concentração mínima inibitória foi baseada na descrita em trabalho de Procópio et al. (2011). Os herbicidas foram submetidos a diluições seriadas de modo a obtenção das concentrações que representaram as doses previamente estabelecidas. Posteriormente foram filtrados em membrana com poros de 0,2 micrómetros para esterilização. Em seguida as soluções dos herbicidas foram misturadas em erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de CN. Para os tratamentos controle foram aplicados os mesmos volumes de água destilada estéril. Posteriormente foi adicionado ao meio 0,1ml do inoculante microbiano.

Em seguida, os tratamentos foram incubados em shaker (30 ± 2° C, 150 rpm) por 48 horas. As células de *N. amazonense* foram quantificadas por absorbância em

espectrofotômetro (600 nm) através de correlação em curva padrão, a partir de um pré-cultivo de amostra pura em CN, conforme metodologia baseada em trabalho de Silva et al., (2008).

Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando significativas, foram feitas curvas de regressão utilizando-se SIGMA-Plot.

5.1.2 Avaliação da resistência de *N. amazonense* à aplicação de herbicidas no solo

O solo utilizado nesse experimento foi retirado de uma mata nativa, localizada no Centro de Ciências Agrárias - UFSCar, Araras, SP, na profundidade de 0,10 m, sem aplicação anterior de pesticida. A análise química do solo foi realizada pelo Laboratório de química e fertilidade do solo do CCA/UFSCar (Tabela 1).

Tabela 1. Análise química de amostras de solo utilizadas no experimento.

Latosolo Vermelho Escuro									
P	M.O.	pH	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CTC	V
mg/dm ³	g/dm ³	Ca Cl ₂	mol _e /dm ³			%			%
19	32	5,4	2,7	60	10	31	72,7	103,7	70

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições, sendo os tratamentos constituídos por: 1) imazapic + *N. amazonense*; 2) indaziflan + *N. amazonense*; 3) *N. amazonense*; 4) controle sem herbicida e sem *N. amazonense*.

As dosagens empregadas para os herbicidas foram imazapic (Plateau ®) - 200 g i.a. ha⁻¹ e indaziflam (Alion ®) - 100g i.a. ha⁻¹.

A bactéria *N. amazonense* (BR 11145), foi obtida da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia. O inoculante com as células de *N. amazonense* foi preparado conforme descrição anterior.

Amostras de solo (1000 g) foram destorroadas e peneiradas em malha de 2 mm, homogeneizadas e posteriormente submetidas ao processo de tinalização, o qual consiste na esterilização do solo para a eliminação de microrganismos edáficos (BASSETO et al., 2008). O solo foi colocado sob pressão de vapor da autoclave, por 20 minutos, durante três dias consecutivos, conforme metodologia descrita por Hungria e Araújo (1994).

Ao solo esterilizado foram adicionados os herbicidas que foram submetidos anteriormente a diluições seriadas, para se obter as concentrações que representam

as doses estabelecidas. Previamente a aplicação, os herbicidas foram filtrados em membrana de 0,22 μm para esterilização. Posteriormente foi realizada a inoculação microbiana do solo, com aplicação do inoculante em dose equivalente a 1,5 L ha⁻¹. Para os tratamentos controle, foram aplicados os mesmos volumes de água destilada estéril. Em seguida, as amostras de solo foram incubadas em temperatura ambiente, por um período de 48 horas.

Para quantificação das células de *N. amazonense*, a metodologia empregada foi baseada na proposta por Videira, Araújo e Baldani (2007). Após o período de incubação foram coletadas de cada tratamento, 10 g de solo, que foram diluídas em 90 ml de solução salina e posteriormente diluídas de forma seriada, acrescentando-se 1 ml da diluição original a tubos de ensaio contendo 9 ml de solução salina, sendo este processo repetido até a diluição 10⁻⁶. De cada diluição, uma amostra (em triplicata) de 0,1 ml foi inoculada em frascos contendo 5 ml de meio de cultura semissólido LGI (Tabela 2), sendo este um meio semisseletivo para o isolamento de *N. amazonense*. Posteriormente os frascos inoculados foram incubados a 30°C por um período de 7 dias.

A contagem da população bacteriana foi realizada através da técnica do número mais provável (NMP), utilizando a tabela de McCrady para três repetições de cada diluição. O crescimento bacteriano foi detectado através da visualização da formação de uma película superficial característica, em forma de véu, no meio semissólido.

Os resultados obtidos na Tabela McCrady foram submetidos à transformação logarítmica, e posteriormente submetidos à análise de variância, e quando significativas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se software Excel do CCA/UFSCar.

Tabela 2. Composição do meio LGI

Reagentes	Quantidade/L
Açúcar Cristal	5g
Agar	1,4 g/L
Azul de Bromotimol a 0,5% em 0,2N de KOH4	5 ml
Cloreto de Cálcio Dihidratado a 1 % P/V4	2 MI
Cloreto Férrico Hexhidratado a 1 % P/V4	1 mL
Extrato de Levedura	0,02 g/L

Fosfato de Potássio Dibásico a 10 % P/V4	2 mL
Fosfato de Potássio Monobásico a 10 % P/V4	6 mL
Molibdato de Sódio Dihidratado a 0,1 % P/V4	2 mL
Nitrato de potássio	1 g/L
Sulfato de Magnésio Heptahidratado a 10 % P/V4	2 mL

Fonte: Adaptado de Döbereiner, Andrade e Baldani (1999)

5.2 Sensibilidade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense* à aplicação de herbicidas.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Centro de Ciências Agrárias da UFSCar, Araras, SP. As unidades experimentais consistiram em vasos de polietileno com capacidade volumétrica de 6,0 litros, os quais foram preenchidos com amostras de solo do tipo Latossolo Vermelho distrófico, cuja análise química e física foi realizada pelo laboratório de química e fertilidade do solo do CCA/ UFSCar (Tabela 1).

O plantio da cana-de-açúcar foi realizado utilizando-se mudas pré-brotadas (MBPs) e a tecnologia adotada foi a AgMusa. As mudas foram plantadas 60 dias após a brotação das gemas e a variedade utilizada foi a RB966928, a qual apresenta como principais características alto perfilhamento, PUI médio e maturação precoce a média. A variedade se destaca como a mais plantada no estado de São Paulo (RIDESA, 2020). A irrigação das mudas foi realizada por sistema de aspersão, de acordo com a demanda evapotranspiratória.

Para aplicação em pré-plantio o delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 5 repetições, utilizando-se esquema fatorial 6 x 2, sendo o primeiro fator constituído pela aplicação dos herbicidas clomazone (720 g i.a. ha⁻¹), imazapic (200 g i.a. ha⁻¹), tebuthiuron (800 g i.a. ha⁻¹), indaziflan (75 g i.a. ha⁻¹), sulfentrazone (800 g i.a. ha⁻¹) e sem herbicida. O segundo fator foi representado pela presença e ausência do inoculante microbiano.

A metodologia utilizada para inoculação de *N. amazonense* foi baseada na descrita por Reis et al. (2009), sendo realizada por meio da imersão do sistema radicular das mudas em solução com concentração de 1x10⁻⁸ UFC ml⁻¹. O transplante das mudas foi realizado imediatamente após a inoculação do produto.

Os tratamentos herbicidas foram aplicados com pulverizador costal pressurizado por CO₂ a pressão constante de 245,16 kPa e barra de aplicação provida

de 4 bicos com pontas de pulverização do tipo leque 110.03. O volume de calda utilizado foi de 200 L ha⁻¹.

As avaliações foram realizadas aos 7, 14, 28 e 56 dias após a aplicação dos herbicidas (DAA). Foram realizadas avaliações visuais de toxicidade dos herbicidas em intervalo compreendido entre 0 (ausência de sintomas) e 100 (morte das plantas), conforme metodologia proposta por Velini et al. (1995).

Aos 56 DAA as plantas de cana-de-açúcar foram avaliadas sendo determinadas a altura (cm), a partir da base até a inserção da primeira folha e a área foliar (cm²), utilizando-se o aparelho Licor-3000C. Em seguida as plantas foram cortadas rente ao solo e determinada a biomassa seca da parte aérea (g), com utilização de estufa a 65°C por período de 48 horas. Para a avaliação do comprimento (cm) e biomassa seca da raiz (g) os vasos foram desmontados e as raízes lavadas e secas em estufa com circulação de ar a 65°C por 48h.

Os dados foram submetidos à análise de variância, e quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando-se software Excel do CCA/UFSCar.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Compatibilidade *in vitro* entre os herbicidas imazapic e indaziflam e a bactéria diazotrófica *N. amazonense*

Os resultados de absorvância, referentes ao crescimento das células de *N. amazonense* em meio contendo diferentes doses de imazapic (Figura 1), evidenciaram interferência negativa deste herbicida no crescimento microbiano a partir da dose comercial. Schwerz et al. (2017) não observaram efeito da molécula sobre o crescimento de *Nitrospirillum amazonense* (anteriormente classificada como *Azospirillum amazonense*), quando esta foi cultivada em meio contendo imazapic na dose comercial em condições *in vitro*.

A ausência de efeitos tóxicos do herbicida imazapic, em doses recomendadas comercialmente, pode ser visualizada sobre outras espécies de bactérias diazotróficas. Procópio et al. (2014), também não verificaram efeito tóxico deste herbicida no crescimento de *Herbaspirillum seropedicae*. Em outros trabalhos também não foram observadas alterações no crescimento e atividade de fixação biológica de nitrogênio de células bacterianas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*, quando cultivadas em meio contendo o herbicida imazapic (PROCÓPIO et al., 2011; PROCÓPIO et al., 2013).

O imazapic é um herbicida inibidor da acetolactato sintase (ALS), enzima que participa da biossíntese dos aminoácidos valina, leucina e isoleucina em microrganismos e plantas (CHRISTOFOLETTI, 2001). A maior interferência dos herbicidas sobre a microbiota do solo, ocorre quando o pesticida atua sobre a biossíntese de aminoácidos ou rotas metabólicas comuns à microrganismos e plantas (SANTOS et al., 2006).

Embora neste trabalho o herbicida imazapic não tenha ocasionado prejuízos a *N. amazonense* até a dose comercial, e considerando relatos na literatura confirmando a não toxicidade deste produto sobre outras espécies de bactérias diazotróficas, não é possível inferir que os resultados visualizados ocorram em razão da resistência destes microrganismos ao mecanismo de ação do herbicida. Procópio et al. (2014) verificaram a ausência de efeitos tóxicos do herbicida imazapic sobre a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, contudo, quando o imazapyr, herbicida pertencente ao mesmo mecanismo de ação e grupo químico foi avaliado, houve

inibição significativa no crescimento do microrganismo.

A toxicidade de um herbicida não está associada somente ao ingrediente ativo, mecanismo de ação ou grupo químico, mas também a fatores relacionados a características físico-químicas do produto comercial. Compostos presentes nas formulações dos agroquímicos, tais como solventes, surfactantes e agentes molhantes, podem estar diretamente associados ao efeito tóxico dos herbicidas sobre os microrganismos (SANTOS et al., 2004).

A elevação da dose do herbicida potencializou seu efeito negativo no crescimento da estirpe. Childs (2007) aponta que em testes *in vitro*, os herbicidas quando em altas concentrações são potencialmente tóxicos aos microrganismos, sendo frequente efeitos inibitórios na quantidade e atividade destes organismos. É importante salientar que nos testes *in vitro*, o contato entre o herbicida e o microrganismo é teoricamente maior que em situação de campo.

Entretanto, diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho, Schwerz et al. (2017) não visualizaram interferências negativas no crescimento da bactéria *N. amazonense* com o aumento na dose do herbicida imazapic, visto que quando o produto foi aplicado na mais alta concentração testada pelos autores, não houve alteração na turbidez do meio em comparação ao tratamento controle. De forma análoga, Pies et al. (2017) verificaram que o crescimento da bactéria diazotrófica *Burkholderia tropica* em meio contendo diferentes doses de imazapic, ao invés de redução, apresentaram aumento nos valores de densidade óptica com o aumento das doses do herbicida.

Em relação ao crescimento de *N. amazonense* em meio contendo o herbicida indaziflam foi possível observar que nenhuma das doses testadas (1/4DC, 1/2DC, DC, 1,5DC, 2DC) diferiram do tratamento controle (Figura 1), demonstrando ausência de efeitos tóxicos do herbicida sobre o microrganismo. O indaziflam é um herbicida pré-emergente pertencente a classe química alkylazine, o qual atua na inibição da parede celular. Embora seja aplicado ao solo em baixas doses, possui longa atividade residual, devido sua alta persistência no solo (GUERRA et al., 2013), podendo, desta forma, estar em contato com a microbiota do solo durante longo período, o que pode interferir na ação do herbicida diferentemente das condições *in vitro*. Ainda são escassos na literatura estudos *in vitro* avaliando a toxicidade do herbicida indaziflam a bactérias diazotróficas associadas a cana-de-açúcar.

Tironi et al. (2009) ressaltam que os microrganismos são submetidos a

máxima exposição às moléculas tóxicas dos herbicidas nos testes *in vitro*, o que não ocorre em condições de campo, onde há fatores externos que atuam sobre o produto químico, atenuando sua toxicidade. Desta forma, quando os herbicidas não apresentam efeitos tóxicos aos microrganismos em testes laboratoriais, é provável que em condições de campo este resultado se confirme.

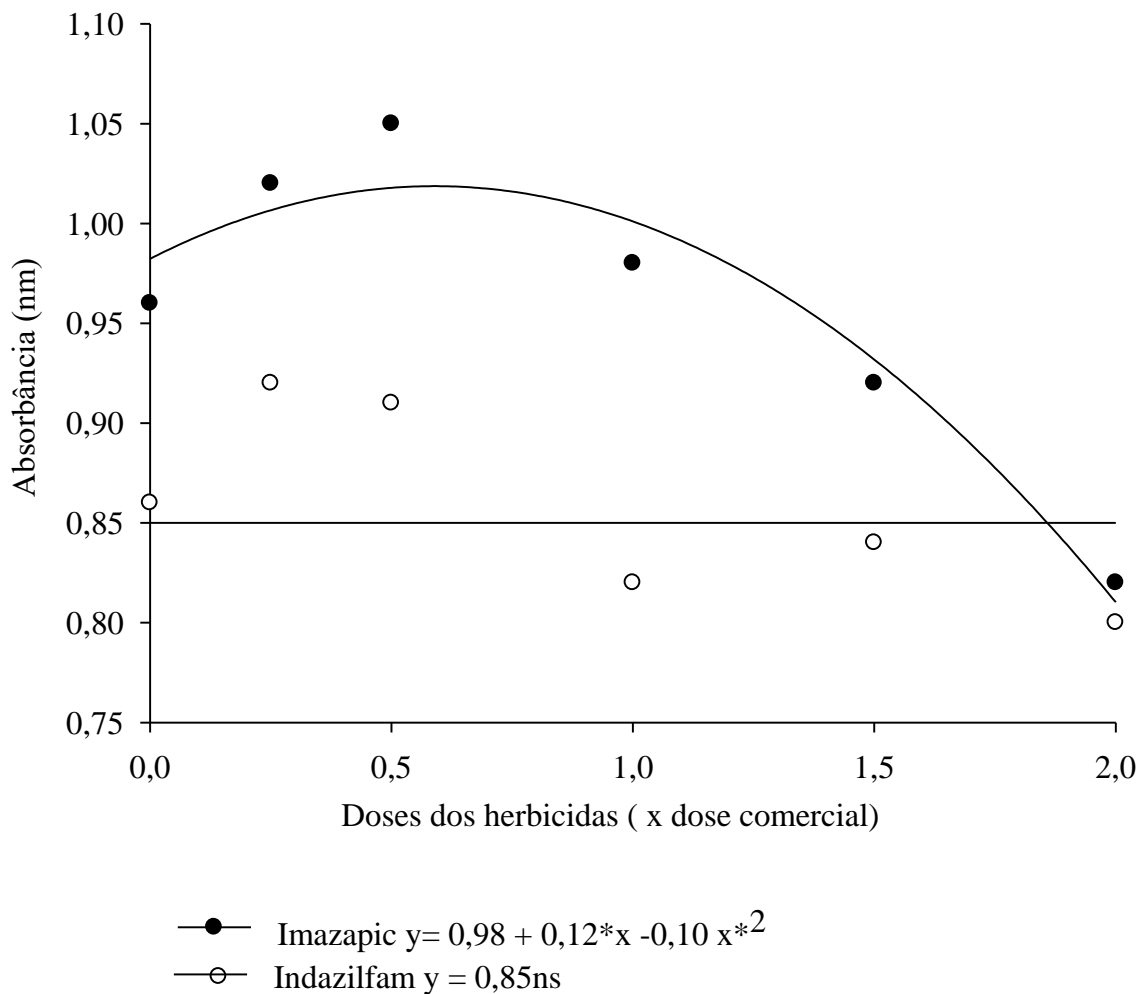


Figura 1. Absorvância de *Nitrospirillum amazonense* em meio contendo diferentes doses dos herbicidas imazapic e indaziflam.

6.2 Sensibilidade de *N. amazonense* a herbicidas aplicados ao solo

Os resultados da sensibilidade da bactéria *N. amazonense* aos herbicidas imazapic e indaziflam aplicados ao solo são apresentados na Tabela 3. Na Figura 2 é possível constatar o crescimento bacteriano pela visualização de película típica e

mudança na coloração do meio de cultivo.

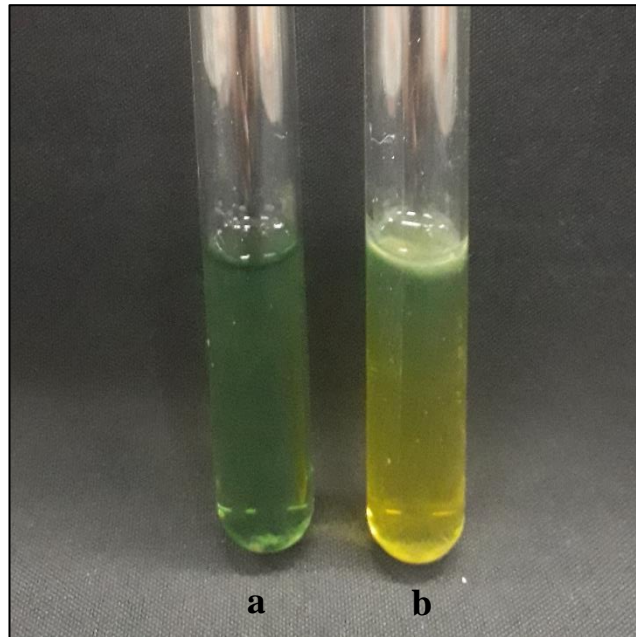


Figura 2. A formação de película superficial e mudança de coloração (Tubo b) confirmam o crescimento de *Nitrospirillum amazonense* em meio semissólido LGI. Araras, 2021.

O crescimento da bactéria *N. amazonense* foi verificado na presença de ambos os herbicidas. Não foram visualizadas neste estudo diferenças significativas no NMP de UFC.g⁻¹ de solo entre os tratamentos que receberam os herbicidas imazapic e indaziflam, em relação ao tratamento que recebeu apenas o inoculante (Tabela 3). Os resultados encontrados corroboram com Koçak et al. (2021), os quais não observaram efeito negativo ou positivo do herbicida indaziflam aplicado ao solo sobre a população microbiana. Torres et al. (2018) verificaram que a aplicação do herbicida indaziflam não ocasionou prejuízos aos microrganismos do solo, mas proporcionou aumento da população microbiana. Na literatura diversos trabalhos relatam a ausência de impactos negativos do herbicida imazapic sobre espécies de bactérias diazotróficas associadas à cana-de-açúcar (PIES et al., 2017; SCHWERZ et al., 2017; PROCOPIO et al., 2011; PROCOPIO et al., 2013; PROCOPIO et al., 2014).

Tabela 3. Log₁₀ do número mais provável de UFC de *Nitrospirillum amazonense* por grama de solo.

Tratamentos	g i.a ha ⁻¹ + L ha ⁻¹	log NMP UFC.g ⁻¹ de solo
Imazapic + <i>N.amazonense</i>	200 + 1,5	5,82 a
Indaziflam + <i>N.amazonense</i>	100 + 1,5	5,37 a
<i>N.amazonense</i>	0 + 1,5	5,28 a
Controle	-	0,00 b
DMS		0,63
CV%		7,25

* As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey 5%.

A aplicação de agrotóxicos pode interferir positivamente na microbiota solo, quando estas moléculas são passíveis de serem metabolizadas pelos microrganismos, ou interferir negativamente, quando possuem a capacidade de intoxicar a população microbiana (FERREIRA, 2016). Diversas são as estratégias utilizadas pelos microrganismos na metabolização de herbicidas: (a) catabolismo: a molécula herbicida é absorvida e quebrada, gerando energia. (b) cometabolismo: o herbicida é transformado por reações metabólicas, mas não é utilizado como fonte de energia (CHILDS, 2007).

No processo de catabolismo, os microrganismos utilizam a energia proveniente das moléculas herbicidas para formação e multiplicação celular. Entretanto, Monquero et al. (2012) relatam que os incrementos iniciais verificados na população microbiana do solo, oriundos da metabolização das moléculas herbicidas, geralmente são seguidos de decréscimo.

Os resultados obtidos neste experimento demonstram que aplicação da dose comercial dos herbicidas imazapic (200 g i.a ha⁻¹) e indaziflam (100 g i.a ha⁻¹) não ocasionam prejuízos a bactéria *N. amazonense* presente no inoculante. A utilização de moléculas herbicidas e formulações não nocivas as bactérias diazotróficas associadas a cana-de-açúcar, possibilitam aumento da produtividade agrícola, sem comprometer a sustentabilidade do sistema.

6.3 Sensibilidade de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com *N. amazonense* à aplicação de herbicidas

Os resultados evidenciaram interação significativa entre diferentes herbicidas e o inoculante aplicado nas mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar (Tabela 4).

Na avaliação realizada aos 7 DAA, considerando as mudas não inoculadas, os herbicidas não diferiram entre si em relação à fitotoxicidade, sendo observados valores baixos de fitointoxicação. Todavia, quando houve a inoculação prévia das mudas, o herbicida indaziflam promoveu fitointoxicação de 41%, sendo 0% no tratamento sem inoculação. Os demais herbicidas não diferiram da testemunha, independentemente da presença ou ausência do inoculante (Tabela 4).

Na comparação entre os herbicidas, na avaliação realizada aos 14 DAA, apenas o tebuthiuron não ocasionou fitotoxicidade nas mudas, independentemente da inoculação ou não das plantas. Quanto ao efeito da inoculação, houve resposta distinta entre os herbicidas, sendo que para o indaziflam, as mudas inoculadas continuaram com maior fitointoxicação em comparação com as não inoculadas, todavia para o imazapic e o clomazone ocorreu o contrário, com injúrias correspondentes a 62 e 54% nas mudas inoculadas e 40 e 33% nas mudas não inoculadas, respectivamente.

Os distintos efeitos da inoculação das MPB's observados nas primeiras avaliações em relação ao impacto dos herbicidas, podem estar relacionados a complexa dinâmica envolvida na associação entre bactéria e planta, e o impacto da presença dos herbicidas sobre estes organismos.

Bactérias diazotróficas associadas às culturas podem promover fixação biológica de nitrogênio, síntese de sideróforos, solubilização de fosfato e potássio e produção de fitormônios promotores de crescimento. Por facilitar a absorção de nutrientes, estes microrganismos proporcionam maior vigor ao sistema fisiológico das plantas (SIMÕES et al., 2018). A disponibilidade e equilíbrio na absorção de nutrientes essenciais permite o aumento na capacidade da planta de realizar suas funções metabólicas, sem sofrer prejuízos quando submetidas a estresses bióticos e abióticos como os causados pela aplicação de herbicidas (ANDRADE, 2020).

Por outro lado, o aumento na eficiência de absorção do sistema radicular, pode favorecer a absorção de herbicidas presentes na solução do solo, elevando o risco de fitointoxicação pelo aumento de exposição a estas moléculas (PEREZ, 2017).

Para o herbicida sulfentrazone, não foi observada influência da inoculação microbiana das MPB's na fitotoxicidade avaliada aos 14 DAA. Manchas vermelhas e necróticas foram visualizadas no limbo foliar das mudas, sendo este sintoma característico dos herbicidas inibidores da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) que atuam promovendo a peroxidação dos lipídios das membranas celulares e provocando conseqüente morte celular (ZOBOLI et al., 2007).

Entretanto, nas avaliações realizadas aos 28 e 56 DAA houve maior recuperação das plantas inoculadas com a rizobactéria, com fitotoxicidade final de 16% nas plantas inoculadas e 36% nas não inoculadas. Esse resultado evidencia que para alguns herbicidas a inoculação das mudas com as rizobactérias pode auxiliar na redução da fitotoxicidade.

A explicação para a maior tolerância aos herbicidas inibidores da PROTOX está relacionada a capacidade das plantas em metabolizar o estresse peroxidativo, potencialmente por meio de sistemas antioxidantes (CARBONARI et al., 2012). Desta forma, a maior recuperação das mudas inoculadas a aplicação de sulfentrazone, pode estar associada a uma maior eficiência fisiológica da planta, resultante da ação benéfica da bactéria diazotrofica *N. amazonense*.

Para os herbicidas indaziflam, imazapic, clomazone e tebuthiuron não foram observadas nas avaliações finais (28 e 56 DAA) diferenças estatísticas entre as plantas inoculadas ou não. Quanto ao efeito fitotóxico dos herbicidas, o imazapic apresentou maior fitotoxicidade. Aos 56 DAA foram verificados valores de 97% e 88% de fitointoxicação para mudas com e sem inoculação, respectivamente. Giraldeli (2018) observou níveis de injúrias de 57,5% quando o imazapic (133 g i.a ha⁻¹) foi aplicado em pré-plantio de MPB's da variedade IACSP95-5000. Semelhantemente Jonck et al. (2020) visualizaram fitointoxicação de 42,5% aos 56 DAA quando a mesma dose do herbicida foi aplicada em mudas pré-brotadas da variedade RB985476. Os níveis maiores de injúrias no presente ensaio podem ser atribuídos as diferenças nas variedades. Pimentel et al. (2021) verificaram que materiais genéticos de MPB de cana-de-açúcar diferentes podem apresentar resposta distinta em relação à fitotoxicidade por herbicidas.

O herbicida indaziflam apresentou fitointoxicação inferior a promovida pelo imazapic, mas ainda pode ser considerada alta (70% e 56%, para mudas inoculadas ou não inoculadas, respectivamente). Os resultados corroboram com os encontrados

por Silva et al. (2019), os quais observaram injurias de 80% do herbicida indaziflam (75 g i.a ha⁻¹) aplicado em MPB da mesma variedade, aos 60 DAA.

Os herbicidas clomazone (720 g i.a ha⁻¹) e sulfentrazone (800 g i.a ha⁻¹) não diferiram entre si, apresentando valores entre 16 e 36% de fitointoxicação.

O tebuthiuron (800 g i.a ha⁻¹) foi o herbicida mais seletivo do estudo, não diferindo da testemunha sem aplicação. Em estudo com essa variedade Silva et al. (2017), também verificaram a seletividade do herbicida tebuthiuron quando este foi aplicado na dose 1.250 g i.a ha⁻¹ no pré-plantio de MPB's.

Tabela 4- Porcentagem de Fitotoxicidade de herbicidas aplicados em pré-plantio de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 com e sem a inoculação de *Nitrospirillum amazonense*, avaliada aos 7, 14, 28 e 56 DAA.

Tratamento	g i.a ha ⁻¹	7 DAA		14 DAA		28 DAA		56 DAA	
		CI	SI	CI	SI	CI	SI	CI	SI
Indaziflam	75	0,00 aB	41,00 aA	20,00 bcB	45,00 aA	50,00 abA	50,00 aA	70,00 bA	56,00 bA
Imazapic	200	10,00 aA	5,00 bA	62,00 aA	40,00 aB	64,00 aA	53,00 aA	97,00 aA	88,00 aA
Clomazone	720	11,00 aA	5,00 bA	54,00 aA	33,00 abB	45,00 abA	50,00 aA	32,00 cA	26,00 cA
Tebuthiron	800	0,00 aA	0,00 bA	1,00 cA	11,00 bcA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 dA
Sulfentrazone	800	5,00 aA	3,00 bA	38,00 abA	46,00 aA	39,00 bB	55,00 aA	16,00 cdB	36,00 cA
Testemunha	-	0,00 aA	0,00 bA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 cA	0,00 bA	0,00 dA	0,00 dA
DMS		15,69	5,87	20,45	8,49	17,64	6,22	13,10	6,18
CV%		167,48	165,17	49,86	54,62	37,08	34,50	26,57	33,07

*CI = com inoculante.; SI = sem inoculante. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas são comparadas na vertical e letras maiúsculas na horizontal pelo teste de Tukey 5% de probabilidade.

Para a altura das mudas houve interação entre herbicidas e inoculação da rizobactéria *N. amazonense* (Tabela 5). O herbicida sulfentrazone e a testemunha sem aplicação apresentaram diferenças significativas quanto ao fator inoculação, com efeito favorável da inoculação. Os resultados observados neste parâmetro corroboram com os encontrados na avaliação visual de fitotoxicidade e confirmam os efeitos benéficos da ação da inoculação microbiana na maior recuperação das mudas pré-brotadas a aplicação do herbicida sulfentrazone.

Os herbicidas indaziflam e imazapic se destacaram quanto ao efeito negativo na altura das plantas, com redução significativa quando comparados a testemunha. Os dados encontrados corroboram com os de Hijano (2016) que visualizou na aplicação de diferentes doses de indaziflam em pré-plantio redução na altura das mudas pré-brotadas da variedade utilizada neste estudo (RB966928). Semelhantemente Kawamoto et al. (2018), observaram redução na altura de MPB's da variedade CTC 16 com a aplicação do herbicida. Todavia, Rocha Neto et al. (2015) não visualizaram diferenças na altura de mudas pré-brotadas da variedade IAC-SP 95 5000 quando o herbicida imazapic foi aplicação em pré-plantio. Esse resultado pode estar relacionado às distintas variedades utilizadas entre os estudos. Independentemente da inoculação, clomazone e tebuthiuron não apresentaram efeito negativo na altura das mudas.

Semelhantemente aos resultados verificados para a altura, também para a área foliar e biomassa seca da parte aérea, os herbicidas imazapic e indaziflam se destacaram negativamente, com médias inferiores dessas variáveis quando comparadas a testemunha sem aplicação (Tabela 5). Para estes herbicidas não foram observadas diferenças significativas entre as mudas que foram ou não previamente inoculadas em nenhum dos parâmetros avaliados.

Para clomazone, tebuthiuron, sulfentrazone e testemunha, a inoculação das mudas pré-brotadas promoveu acréscimos superiores a 40% na área foliar e biomassa seca da parte aérea, quando comparadas as mudas não inoculadas. Os resultados corroboram com os encontrados por Santos (2007) que na inoculação isolada de diferentes estirpes de bactérias diazotróficas observou aumento no número de folhas, na área foliar e acréscimo de 50% na biomassa seca da parte aérea das mudas pré-brotadas da variedade RB966928 utilizada neste estudo. De modo análogo, Gírio et al. (2015) verificaram que a inoculação de bactérias promotoras de

crescimento em MPB da variedade RB 867515 resultou em aumento na altura, perfilhamento e matéria seca das plantas inoculadas.

Os resultados observados demonstram a ação benéfica da inoculação de *N. amazonense* para a cultivar RB966928. O incremento da área foliar nos estágios iniciais de desenvolvimento da cana-de-açúcar influencia na interceptação da radiação solar e se relaciona diretamente ao potencial produtivo da cultura. Maiores áreas foliares nos estágios iniciais da cultura comumente estão associadas a maior produção final de colmos (OLIVEIRA et al., 2007).

Deste modo, a análise das variáveis de crescimento das mudas permite afirmar que a aplicação dos herbicidas clomazone (720 g i.a ha⁻¹), tebuthiron (800 g i.a ha⁻¹) e sulfentrazone (800 g i.a ha⁻¹) não interfere no efeito promotor de crescimento da bactéria, considerando que mesmo na presença destes herbicidas as mudas apresentaram efeito favorável da inoculação pela bactéria *N. amazonense*. A inoculação das mudas também não aumentou a sensibilidade destas aos tratamentos herbicidas aplicados no pré-plantio das mudas pré-brotadas, sendo, portanto, adequado seu uso nesse sistema de plantio.

Tabela 5- Altura, área foliar e biomassa da parte aérea de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 com e sem a inoculação de *Nitrospirillum amazonense*, avaliada aos 56 DAA.

Tratamento	g i.a ha ⁻¹	Altura (cm)		Área foliar (cm ²)		Biomassa (g)	
		CI	SI	CI	SI	CI	SI
Indaziflam	75	13,00 bA	14,00 bcA	40,61 cA	90,33 bcA	4,42 bcA	2,97 abA
Imazapic	200	7,60 bA	11,40 cA	8,92 cA	35,46 cA	1,64 cA	1,48 bA
Clomazone	720	25,20 aA	21,20 abA	412,08 abA	257,70 aB	7,38 aA	4,28 abB
Tebuthiron	800	27,00 aA	21,80 aA	408,30 abA	257,01 aB	7,18 abA	4,18 abB
Sulfentrazone	800	25,40 aA	18,20 abcB	342,90 bA	183,89 abB	6,93 abA	4,06 abB
Testemunha	-	31,00 aA	22,40 aB	469,75aA	276,42 aB	8,40 aA	5,26 aB
DMS		5,37	2,30	82,84	34,54	2,33	0,68
CV%		19,24	21,71	25,41	27,94	34,24	26,38

*CI = com inoculante.; SI = sem inoculante. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas são comparadas na vertical e letras maiúsculas na horizontal pelo teste de Tukey 5%.

Para o comprimento e biomassa seca da raiz não houve efeito da inoculação, exceto para o tratamento clomazone (720 g i.a ha⁻¹), que apresentou maior biomassa

seca da raiz nas mudas inoculadas (Tabela 8). Gírio et al. (2015), também não observaram diferenças significativas em relação ao aumento da biomassa seca das raízes de mudas de cana-de-açúcar da variedade RB867515, quando estas foram inoculadas com 5 estirpes de BPC. Diferentemente, Matoso et al (2016) observaram aumento significativo no volume e fitomassa das raízes de mudas da variedade RB966928 inoculadas com *Nitrospirillum amazonense* (Anteriormente classificada *Azospirillum amazonense*). Todavia, para a variedade RB867515 estes autores verificaram efeito favorável da inoculação, sendo em maior proporção na parte aérea das mudas em relação a biomassa do sistema radicular.

O efeito promotor de crescimento pode estar relacionado não apenas ao aumento no comprimento das raízes, mas também a mudanças morfológicas no sistema radicular. O maior desenvolvimento de raízes laterais e pelos radiculares, que embora sejam mais finos e de menor comprimento, permitem uma maior eficiência na absorção de água e nutrientes (MATOSO et al., 2016). A resposta biológica quanto a inoculação de bactérias diazotróficas pode ser variável por estar relacionada a diversos fatores como genótipo da planta e características do ambiente, podendo haver alterações no desenvolvimento inicial e alocação de biomassa entre diferentes variedades e também dentro de uma mesma variedade, considerando a interação genótipo-ambiente (SANTOS, 2012; SILVA et al., 2009).

Ainda, a ausência de diferenças significativas da inoculação microbiana nos parâmetros biométricos comprimento e biomassa seca da raiz, pode também estar relacionada a complexidade da execução da avaliação destas variáveis, visto que, raízes mais finas e pelos radiculares, responsáveis pelo aumento da área de absorção da raiz, podem ter se prendido ao solo argiloso, sendo perdidas durante a lavagem e extração do sistema radicular.

Em relação aos efeitos dos herbicidas no comprimento e biomassa seca da raiz, o imazapic se destacou negativamente, sendo visualizada redução de até 10 vezes no comprimento radicular em relação a testemunha. O imazapic atua na inibição da enzima acetolactato sintetase (ALS) impedindo a síntese de aminoácidos essenciais (leucina, isoleucina e valina) a produção de novas células. A paralização do crescimento da parte aérea e a redução do número e comprimento das raízes são sintomas características dos herbicidas que possuem este mecanismo de ação (MARCHI, MARCHI e GUIMARÃES, 2008), o que explica seu efeito supressor nas raízes das mudas.

Tabela 6- Comprimento da raiz e biomassa seca da raiz de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar da variedade RB966928 transplantadas com e sem inoculação de *N. amazonense*, avaliados aos 56 DAA.

Tratamento	g i.a ha ⁻¹	Comprimento da raiz (cm)		Biomassa da raiz (g)	
		CI	SI	CI	SI
Indaziflam	75	13,00 cA	20,90 bA	10,94 bA	9,43 bA
Imazapic	200	7,00 cA	7,00 bA	4,66 cA	5,23 bA
Clomazone	720	65,50 abA	64,40 aA	18,13 aA	9,05 bB
Tebuthiron	800	56,80 bA	68,80 aA	12,76 abA	9,70 bA
Sulfentrazone	800	54,80 bA	59,80 aA	11,52 bA	8,12 bA
Testemunha	-	73,20 aA	65,20 aA	17,17 aA	15,15 aA
DMS		10,74	4,98	4,12	1,49
CV%		16,48	20,14	26,69	25,52

*CI = com inoculante.; SI = sem inoculante. As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Letras minúsculas são comparadas na vertical e letras maiúsculas na horizontal pelo teste de Tukey 5%.

7. CONCLUSÃO

Para as condições do presente estudo, pode-se concluir que:

- O herbicida indaziflam não interferiu no crescimento *in vitro* de *N. amazonense* nas doses avaliadas. O crescimento da bactéria foi inibido pelo herbicida imazapic a partir da dose recomendada.
- Os herbicidas imazapic (200 g i.a ha⁻¹) e indaziflam (100 g i.a ha⁻¹) aplicados ao solo não foram nocivos ao crescimento de *N. amazonense*.
- Mudanças pré-brotadas da variedade RB966928 de cana-de-açúcar foram altamente suscetíveis ao herbicida imazapic independentemente da inoculação com *N. amazonense*.
- Os herbicidas clomazone, sulfentrazone e tebuthiuron não interferiram no efeito promotor de crescimento de *N. amazonense* em mudas pré-brotadas da variedade RB966928
- A inoculação com *N. amazonense* não alterou a sensibilidade das mudas pré-brotadas em relação aos herbicidas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, J. F. **Fisioativadores e a fitotoxidade causada pelos herbicidas sulfentrazone, imazapic e clomazone na cultura da cana-de-açúcar.** Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

BASSETO, M. A.; FILHO, W. V. V.; SOUZA, E. C.; CERESINI, P. C. O papel de *Rhizoctonia* spp. binucleadas na indução de resistência a mela da soja. **Maringá**, v. 30, n. 2, p. 183-189, 2008

CAMPOS, J. T.; **Rizobactérias promotoras de crescimento de cana-de-açúcar** - Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônomo de Campinas IAC, Campinas, 2010.

CARBONARI, C. A.; VELINI, E. D.; GOMES, G. L. G. C.; TAKAHASHI, E. N.; ARALDI, R. **Seletividade e absorção radicular do sulfentrazone em clones de eucalipto.** *Planta Daninha*, v. 30, n. 1, p. 147-153, Viçosa, 2012.

CASSETARI, A. S.; **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas** - Tese (Doutorado em Solos e nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

CHAVES, V. A.; SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M.; Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, p. 1595-1602, março, 2015.

CHILDS, G. M. F.; **Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado.** Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2007.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento.; **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar - Safra 2021/2022**, v.8, n.1, Primeiro Levantamento, maio, 2021.

COSTA, E. M.; CARVALHO, F.; ESTEVES, J. A.; NÓBREGA, S. A.; MOREIRA, F. M. S.; Resposta da Soja a inoculação e co-inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal e *Bradyrhizobium*. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19; p. 2014.

COSTA, C. B. S. K.; **Monitoramento do estabelecimento das bactérias presentes no inoculante da Embrapa, durante o desenvolvimento inicial de plantas de cana-de-açúcar utilizando técnicas microbiológicas e moleculares.** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

CHRISTOFOLETTI, P. J.; Bioensaio para determinação da resistência de plantas

daninhas aos herbicidas inibidores da ALS. **Bragantia**, v.60, n.3, p.261-265, Campinas, 2001.

DAS, A. C.; DEBNATH, A. Effect of systemic herbicides on N₂-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. **Chemosphere**, v.65, n.6, p.1082-1086, 2006.

DIAS, JOSÉ LUIZ CARVALHO DE SOUZA. **Seletividade de herbicidas em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar** - Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2014.

DÖBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. D.; Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. **Embrapa Agrobiologia (Documento nº110)**, ISSN 0104-6187, Seropédica, RJ, 1999.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Inoculante para fixação de nitrogênio para cana é lançado pela Basf e Embrapa** - Notícias, 2018. Disponível em: Acesso: 19/01/2020.

FERREIRA, P. S. H.; **Seletividade dos herbicidas amicarbazone e sulfentrazone para cana soca seca, utilizando-se testemunha pareada, e ação na microbiota do solo**. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2016.

FERREIRA, T. E.; **Decomposição da palha de cana-de-açúcar em área de recolhimento variável sob adubação nitrogenada mineral ou inoculação com bactérias diazotróficas** - Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2017.

FERREIRA, N. S.; MATOS, G. F.; ROUWS, J. R. C.; REIS, V. M.; ROUWS, L. F. M.; Inoculação com *Rhizobium* sp. acelera a brotação de minitoletes de cana-de-açúcar cultivar RB867515. **III Simpósio Nacional de estudos para a produção vegetal no semiárido**, 2018.

FRANCO, H. C. J.; **Eficiência Agronômica da adubação nitrogenada de cana-planta** - Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

GALON, L.; TIRONI, S. P.; SILVA, A. F.; BEUTLER, A. N.; ROCHA, P. R. R.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A.; Disponibilidade de macronutrientes em cultivares de cana-de-açúcar submetidas à competição com *Brachiaria brizantha*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.8, p.1372-1379, ago, 2012.

GARCIA, M. P.; **Seletividade de tratamentos herbicidas em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar CTC 14** – Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2016.

GIRALDELI, A. L. **Manejo de *Cyperus rotundus* L. em cana-de-açúcar no sistema**

de mudas pré-brotadas. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

GÍRIO, L. A. S.; **Eficiência Agronômica de bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar (Saccharum spp.)** - Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.

GIRÍO, L. A. S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.50, n.1, p.33-43, Brasília, 2015.

GUERRA, N.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. S.; CONSTANTIN, J.; OLIVEIRA NETO, A. M.; BRAZ, G. B. P.; Aminocyclopyrachlor e indaziflam: Seletividade, controle e comportamento no ambiente. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.12, n.3, p.285-295, set./dez. 2013.

HIJANO, N. **Interferência de capim-camalote em cana-de-açúcar e seletividade de indaziflam + metribuzin aplicados em cana de açúcar no sistema MPB.** Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

HUNGRIA; M.; ARAÚJO, R. S.; Manual de Métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. EMBRAPA-CNPAP - Documentos, 46, ISSN 0101-9716, Brasília, DF, 1994.

JONCK, L. C. G.; ROESLER, G. D. R.; SANTOS, S. R. B.; HIRATA, A. C. S.; MONQUERO, P. A.; Biocarvão como atenuante da fitotoxicidade de herbicidas em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.19, n.1, 2020.

KAWAMOTO, E. K.; LEITE, S. M. M.; SOUZA, L. S. Avaliação da seletividade do indaziflam em mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Revista Unimar Ciências**, v.27, n.1-2, 2018.

KOÇAK, B.; CENKSEVEN, S.; KIZILDAG, N.; SAGLIKER, H. A.; DARICI, C.; How did the Addition of Indaziflam Affect on Carbon and Nitrogen Mineralizations in a Vineyard Soil? **International Journal of Life Sciences and Biotechnology**, v.4, p.1-12, 2021.

LANDELL, M. G. A.; CAMPANA, M. P.; FIGUEIREDO, P.; XAVIER, M. A.; ANJOS, I. A. dos; DINARDO-MIRANDO, L. L.; SCARPARI, M. S.; GARCIA, J. C.; BIDÓIA, M.A. P.; SILVA, D. N. da; MENDONÇA, J. R. de; KANTHACK, R. A. D.; CAMPOS, M. F. de; BRANCALIÃO, S. R.; PETRÍ, R. H.; MIGUEL, P. E. M. **Sistema de multiplicação de cana-de-açúcar com uso de mudas pré-brotadas (MPB), oriundas de gemas individualizadas.** (Documentos, 109) - Campinas: IAC, 2012.

LINO, A. C. M.; **Fixação biológica de nitrogênio em soqueira de cana-de-açúcar com Azospirillum brasilense e na compatibilidade com agroquímicos -**

Dissertação (Mestrado em Solos) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

LOPES, V. R.; **Melhoramento genético de cana-de-açúcar em associação com bactérias promotoras de crescimento vegetal** - Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MASSESSINI, A. M.; COSTA, M. D.; REIS, M. R.; SILVA, A. A.; Atividade de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato na presença de formulações comerciais de glyphosate. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 815-823, Viçosa-MG, 2008.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. **Embrapa Cerrados** - (Documento 227), Planaltina, Distrito Federal, 2008.

MATOSO, S. S.; MARCO, E.; BELLÉ, C.; RODRIGUES, T. A.; ANJOS, S. D.; SILVA. Desenvolvimento inicial de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Jornada de Pós-graduação e Pesquisa Congrega URCAMP**, v.13, p.412-434, Bagé, Rio Grande do Sul, 2016.

MATOSO, E. S.; **Potencial da mistura de cinco bactérias diazotróficas no desenvolvimento e produção de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

MONQUERO, P. A.; REIS, F. C.; MUNHOZ, W. S.; HIRATA, A. C. S.; MENEGHIN, S. P. Solo cultivado com cana-de-açúcar: persistência e impacto de herbicidas na microbiota no solo. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.7, n.3, p.380-387, Recife, 2012.

NETO, J. M. P.; **Desempenho agrônomo da cana-de-açúcar (Saccharum officinarum) em resposta a adubação nitrogenada e potássica** - Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia - Paraíba, 2019.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I.; **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Embrapa Agrobiologia (Documento 161) - Seropédica, Rio de Janeiro, 2003.

OLIVEIRA, R. A.; DAROS, E.; ZAMBOM, J. L. C.; WEBER, H.; IDO, O. T.; BESPALHOK-FILHO, J. C.; RIBAS, K. C. Z.; SILVA, D. K. T. Área foliar em três cultivares de cana-de-açúcar e sua correlação com a produção de biomassa. **Pesquisa agropecuária tropical**, v.37, n.2, p.71-76, Goiânia, 2007.

OLIVEIRA, E. C. A.; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, R. I.; FREIRE, M. B. G. S.; NETO, D. E. S.; SILVA, S. A. M.; Extração e Exportação de nutrientes por variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Recife, v. 34, p.1343- 1352, 2010.

OLIVER, R.; **Interação entre bactérias diazotróficas e doses de N-fertilizante na cultura da cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2014.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. S.; SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M.; Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 363-370, abr-jun, 2013.

PEREZ, L. L.; **Seletividade de sulfentrazone e clomazone aplicados em pré-plantio de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar CTC 11**. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

PETERS, L. P.; **Efeito dos herbicidas ametrina e clomazone no sistema antioxidante bacteriano**. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

PIES, W.; TIRONI, S. P.; SCHWERZ, L. A.; LUZ, A. C. P.; PETRY, S.; WERLANG, T.; Desenvolvimento e fixação de nitrogênio da bactéria *Burkholderia tropica* em diferentes doses de herbicidas. **9º SIEPE - Salão Internacional de ensino pesquisa e extensão**, v.9, n.4, Apresentação Pôster, novembro, 2017.

PIMENTEL, G.V.; COSTA, W.M.N.; SOUZA, W.J.G.; MARTINS, I.A.; MOREIRA, S.G. Seletividade do herbicida tembotrione em genótipos de cana-de-açúcar no sistema de mudas pré-brotadas. **Agrarian**, Dourados, v. 14, n. 52, p. 166-175, 2021.

PROCÓPIO, S. O., FERNANDES, M. F., TELES, D. A., SENA FILHO, J. G., C. FILHO, A., VARGAS, L. e SANT'ANNA, S.A.C.; Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar à bactéria diazotrófica *Azospirillum brasilense*. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 29, p. 1079-1089, 2011.

PROCÓPIO, S. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; FILHO, J. G. S.; FILHO, A. C.; VARGAS, L. Tolerância da bactéria diazotrófica *Gluconacetobacter diazotrophicus* a herbicidas utilizados na cultura da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.8, n.4, p.610-617, 2013.

PROCÓPIO, S. O.; FERNANDES, M. F.; TELES, D. A.; FILHO, J. G. S.; FILHO, A. C.; RESENDE, M. A.; VARGAS, L.; Toxicidade de herbicidas utilizados na cultura da cana-de açúcar à bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 5, p. 2383-2398, set./out. 2014.

REIS, V. M.; **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Embrapa Agrobiologia (Documento 232) Seropédica - Rio de Janeiro, 2007.

REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; **Eficiência agrônômica do inoculante de cana-de-açúcar aplicado em três ensaios conduzidos no Estado do Rio de Janeiro durante o primeiro ano de cultivo** - Boletim de Pesquisa e desenvolvimento 45, Seropédica, Rio de Janeiro, 2009.

ROCHA NETO, A. R. da; AZANIA, C. A. M.; BORGES, I. S.; VITORINO, R.; MARCHINE, N. M.; AZANIA, A. P. M. Tolerância de mudas pré brotadas de cana-de-açúcar a herbicidas aplicados em pré plantio. **IX Workshop Agroenergia**, Ribeirão

Preto, 2015.

SALVIANO, A. M.; MOURA, M. S. B.; SILVA, T. G. F.; CARMO, J. F. A.; BRANDÃO, E. O.; Acúmulo de exportação de macronutrientes pela cana de açúcar irrigada no semiárido brasileiro. **Revista Científica Intelletto**, v.2, n.2, p.16-27, 2017.

SANTOS, J. B.; JACQUES, R. J. S.; PROCÓPIO, S. O.; KASUYA, M. C. M.; SILVIA, A. A.; SANTOS, E. A.; Efeitos de diferentes formulações comerciais de glyphosate sobre estirpes de *Bradyrhizobium*. **Planta Daninha**, v.22, n.2, p.293-299, Viçosa-MG, 2004.

SANTOS, J. B. et al. Tolerance of Bradyrhizobium strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, v. 24, p. 543-547, 2005.

SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R.; SANTOS, E. A.; Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de Rhizobium tropici. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 24, n. 3, p. 457-465, 2006.

SANTOS, S. G. **Mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas: desenvolvimento e metabolismo de nitrogênio**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2007.

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

SCUDELETTI, D.; **Modos de inoculação de Azospirillum brasilense em cana-de-açúcar** - Dissertação (Mestrado em Agricultura) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2016.

SCHWERZ, L. A.; PETRY, S.; PIES, W.; LUZ, A. C. P.; WERLANG, T.; TIRONI, S. P. Desenvolvimento e fixação de nitrogênio in vitro de Azospirillum amazonense em diferentes doses de herbicidas. **Anais do IX Salão Internacional de ensino, pesquisa e extensão – SIEPE**, Santana do Livramento, 2017. Disponível em:< https://guri.unipampa.edu.br/uploads/evt/arq_trabalhos/14608/seer_14608.pdf> Acesso: 16 fev. 2021.

SCHWERZ, L. A.; TIRONI, S. P.; PETRY, S.; PIES, W.; LUZ, A. C. P.; WERLANG, T.; Desenvolvimento e fixação de nitrogênio in vitro de Azospirillum amazonense em diferentes doses de herbicidas. **9º SIEPE - Salão Internacional de ensino pesquisa e extensão**, v.9, n.4, Apresentação Pôster, novembro, 2017.

SILVA, E. R. L.; ALVES, L. F. A.; SANTOS, J.; POTRICH, M.; SENE, L.; Técnicas para avaliação in vitro do efeito de herbicidas sobre Bacillus thuringiensis berliner var. Kurstaki. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.75, n.1, p.59-67, jan./mar., 2008.

SILVA, M. F.; OLIVEIRA, P. J.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G.; REIS, V. M. Inoculantes formulados com polímeros e bactérias endofíticas para a cultura da

cana-de-açúcar.

Pesquisa agropecuária brasileira, v.44, n.11, p.1437-1443, Brasília, 2009.

SILVA, G. S.; MELO, C. A. D.; FIALHO, C. M. T.; SANTOS, L. D. T.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A.; Impacto de sulfentrazone, isoxaflutol e oxyfluorfen sobre a microbiota de dois solos florestais. **Bragantia**, Campinas, v. 73, n. 3, p.292-299, 2014.

SILVA, M. O.; FREIRE, F. J.; JUNIOR, M. A. L.; SOBRAL, J. K.; COSTA, D. P.; CADETE, L. L.; Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.36, n. 4, p. 1113-1121, 2012.

SILVA, R. P.; TORRES, B. A.; SOUZA, J. L.; SANTOS, P. H. V.; MONQUERO, P. A. Uso de herbicidas no controle de plantas daninhas e em mudas pré-brotadas (MBPS) de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 18, n.1. 2019.

SILVA, G. S.; SILVA, A. F. M.; GIRALDELI, A. L.; GHIRARDELLO, G. A.; FILHO, R. V.; TOLEDO, R. E. B.; Manejo de plantas daninhas no sistema de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v.17, n.1, p.86-94, jan./mar. 2018.

SILVA, P. V.; VIANA, H. R. M.; MALARDO, M. R.; DIAS, R. C.; INÁCIO, E, M.; RIBEIRO, N. M.; MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Sensibilidade de mudas pré-brotadas e minirrebolos de cana-de-açúcar a herbicidas pré-emergentes. **Nativa**, v. 8, n. 4, p. 498-505, jul./ago. 2020

SIMÕES, W. L.; OLIVEIRA, A. R.; REIS, V. M.; PEREIRA, W.; LIMA, J. A. Aplicação de bactérias diazotróficas via sistema de irrigação para fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar. **Energia na Agricultura**, v.33, n.1, p.45-51, Botucatu, 2018.

TIRONI, S. P. REIS, M. R.; SILVA, A. F.; FERREIRA, E. A.; BARBOSA, M. H. P.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A.; GALON, L. Impacto de herbicidas na biomassa microbiana e nos microrganismos solubilizadores de ortofosfato do solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 27, p. 1053-1062, Viçosa-MG, 2009.

TORRES, B. A.; MENEGHIN, S. P.; RIBEIRO, N. M.; SANTOS, P. H. V.; SCHEDENFFEDLDT, B. F.; MONQUERO, P. A.; Saflufenacil and indaziflam herbicide effects on agricultural crops and microorganisms. **African Journal of Agricultural Research**, Vol. 13(16), pp. 872-885, 19 April, 2018.

UNICA, União da Indústria de cana-de-açúcar.; Bioeletricidade. Disponível em: <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/bioeletricidade/>. Acesso: 18/07/2021.

VELINI, E. D.; OSIPE, R.; GAZZIERO, D. L. P. Procedimentos para a instalação e análise de experimentos com herbicidas. p.21 Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 1995.

VENTURA, M. V. A.; **Influência de fungos micorrízicos arbusculares no estabelecimento de mudas pré-brotadas de cana-de-açúcar** - Monografia (Bacharel em Agronomia) - Faculdade Evangélica de Goianésia, Goias, 2017.

VIDEIRA, S. S.; ARAUJO, J. L. S; BALDANI, V. L. D.; Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não leguminosas. **Embrapa Agrobiologia (Documentos 234)** – Seropédica, RJ, 2007.

ZOBOLI, L. H. S.; OLIVEIRA JR., R. S.; TORMENA, C.A.; CONSTANTIN, J.; CAVALIERI, S. D.; ALONSO, D. G.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. Efeito da compactação do solo e do sulfentrazone sobre a cultura da soja em duas condições de água no solo. **Planta daninha**, v.25, n.3, p. 537-545, Viçosa, 2007.

