

# Produtividade e diluição isotópica de $^{15}\text{N}$ em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas

Nivaldo Schultz<sup>(1)</sup>, Willian Pereira<sup>(1)</sup>, Veronica Massena Reis<sup>(2)</sup> e Segundo Sacramento Urquiaga<sup>(2)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia, Departamento de Ciência do Solo, Rodovia BR 465, Km 7, CEP 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: nivaldods@ufrj.br, willpmg@yahoo.com.br <sup>(2)</sup>Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, CEP 23890-000 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: segundo.urquiaga@embrapa.br, veronica.massena@embrapa.br

**Resumo** – O objetivo deste trabalho foi avaliar a produtividade e a diluição do isótopo  $^{15}\text{N}$  de duas variedades de cana-de-açúcar, inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. Dois experimentos foram realizados nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil, durante três safras (2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010): o primeiro em Argissolo Vermelho eutrófico, de textura argilosa, e o segundo em Planossolo Háplico distrófico, de textura média. Utilizou-se o delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições. As variedades testadas foram a RB867515 e a RB72454, cultivadas com inoculação com bactérias diazotróficas (cinco estirpes combinadas no inoculante para cana-de-açúcar) ou com adubação de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N, além do controle experimental sem inoculação e sem adubação. Avaliaram-se a produtividade de colmos e a diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira. A variedade RB72454 foi mais responsiva aos tratamentos, nos ciclos de cana-planta e na segunda soca. A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira diminuiu ao longo dos anos, o que indica aumento da fixação biológica de N na medida em que a disponibilidade de N do solo vem sendo reduzida.

**Termos para indexação:** *Saccharum*, bactérias endofíticas, fixação biológica de N, inoculante para cana-de-açúcar.

## Productivity and $^{15}\text{N}$ isotope dilution of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria

**Abstract** – The objective of this work was to evaluate the productivity and  $^{15}\text{N}$  isotope dilution of two sugarcane varieties inoculated or not with diazotrophic bacteria. Two experiments were carried out in the Southeast and Northeast regions of Brazil, during three cropping seasons (2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010): the first one on a clayey Acrisol, and the second one on a medium-textured Planosol. A randomized complete block design, with four replicates was used. The varieties RB867515 and RB72454 were tested with inoculation of diazotrophic bacteria (five strains combined in the inoculant for sugarcane) or fertilization with 120 kg ha<sup>-1</sup> N, besides the control treatment without inoculation and nitrogen fertilization. Stalk yield and  $^{15}\text{N}$  isotope dilution of the flag-leaves were evaluated. The RB72454 variety showed greater response to the treatments during the plant-cane cycle and the second ratoon.  $^{15}\text{N}$  natural abundance in the flag-leaves decreases over the years, which suggests the increase of biological N fixation when N availability in soil reduces.

**Index terms:** *Saccharum*, endophytic bacteria, N biological fixation, inoculant for sugarcane.

## Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) é uma das espécies mais estudadas quanto à nutrição nitrogenada nos últimos anos. De maneira geral a fertilização nitrogenada apresenta baixa eficiência na cultura, com pequeno aproveitamento do N aplicado, principalmente no ciclo de cana-planta (Vitti et al., 2008; Schultz et al., 2012). Nas socas, as respostas à adubação nitrogenada são mais frequentes; entretanto, as diferenças entre as doses aplicadas e a quantidade de N acumulado pela cultura ainda são expressivas. Atualmente no Brasil,

são aplicados, em média, 45 kg ha<sup>-1</sup> de N na cana-planta e 80 kg ha<sup>-1</sup> nas socas, ao passo que o acúmulo de N total nas folhas verdes e secas e nos colmos pode chegar a 260 kg ha<sup>-1</sup> na cana-planta (Vitti et al., 2011) e, em média, a 120 kg ha<sup>-1</sup> nas socas (Vitti et al., 2008; Baptista et al., 2014).

O acúmulo de N em quantidades expressivamente superiores às doses aplicadas nos canaviais brasileiros tem estimulado a investigação sobre o benefício da interação da cana-de-açúcar com bactérias endofíticas fixadoras de N, e quanto à possibilidade de se fornecer

parte do N acumulado pela planta por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Döbereiner, 1961). Diversos estudos foram conduzidos para confirmação do potencial natural da cultura em fixar o N da atmosfera (Yoneyama et al., 1997; Boddey et al., 2001; Urquiaga et al., 2012). Nessas avaliações, foram constatados valores da contribuição relativa da FBN entre zero e 70% do N acumulado. As principais razões apontadas para essa grande variabilidade foram diferenças varietais, condições edafoclimáticas e diferenças nas metodologias de avaliação (Unkovich et al., 2008). Por tratar-se da interação entre dois organismos vivos, a FBN é bastante sensível às condições edafoclimáticas.

A descoberta da FBN pela cana-de-açúcar abriu caminho para as pesquisas para a elaboração de inoculante à base de bactérias diazotróficas (Oliveira et al., 2003). Entretanto, resultados de ensaios desenvolvidos em diferentes regiões produtoras do Brasil mostraram que apenas em poucos casos o inoculante influencia na FBN, apesar de relatos de aumentos significativos na produção de biomassa aérea e raízes (Pereira et al., 2013; Gírio et al., 2015), bem como na produtividade de colmos (Oliveira et al., 2006; Schultz et al., 2012, 2014), atribuídos a efeitos de promotores de crescimento vegetal (Bashan et al., 2004; Gírio et al., 2015).

Avanços nas técnicas que utilizam a relação isotópica  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$  no solo e nos tecidos das plantas (Unkovich et al., 2008) evidenciam que o processo natural de FBN contribui significativamente para a nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar (Urquiaga et al., 2012). Essas técnicas mostram, ainda, que o isótopo  $^{15}\text{N}$  dilui-se nos tecidos das plantas com a diminuição do N disponível no solo, e que há redução gradual de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos das plantas na medida em que o solo é exaurido com as colheitas sucessivas da cana-de-açúcar (Urquiaga et al., 2012). Segundo Unkovich et al. (2008), a redução da concentração do isótopo  $^{15}\text{N}$  nos tecidos vegetais ocorre devido à FBN, que incorpora o  $\text{N}_2$  atmosférico com 0,3663% de átomos de  $^{15}\text{N}$  (valor padrão da atmosfera), enquanto o N disponível no solo normalmente apresenta concentrações superiores do isótopo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da inoculação com bactérias diazotróficas na produtividade e na diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  na cultura da cana-de-açúcar, bem como a diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  naturalmente associada à cultura.

## Material e Métodos

Os experimentos foram desenvolvidos em áreas de cultivos comerciais de cana-de-açúcar, nas usinas Cruangi, localizada no município de Goiana, PE ( $7^{\circ}33'39''\text{S}$ ;  $35^{\circ}0'10''\text{W}$ ; e 80 m de altitude), ao longo das safras 2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010; e na usina Cruz Alta Guarani, localizada no município de Olímpia, SP ( $20^{\circ}44'13''\text{S}$ ;  $48^{\circ}54'54''\text{W}$ ; e 506 m de altitude), nas safras de 2008/2009, 2009/2010 e 2010/2011. Os solos foram classificados de acordo com Santos et al. (2013) como Planossolo Háplico distrófico textura média e Argissolo Vermelho eutrófico textura argilosa, respectivamente. Nos dois casos, foram avaliados os ciclos de cana-planta, primeira soca e segunda soca. Na usina Cruangi, as três colheitas foram realizadas após 12 meses de cultivo, tanto para o ciclo de cana-planta como para as duas socas. Na usina Cruz Alta Guarani, a cana-planta foi colhida 15 meses após o plantio, e as duas socas com 12 meses de desenvolvimento após cada colheita. Na região da usina Cruangi, o clima é do tipo Aw, segundo classificação de Köppen, com temperatura média anual de  $24,6^{\circ}\text{C}$ . O clima da região de Olímpia, onde está localizada a usina Cruz Alta Guarani é do tipo Aw, segundo classificação de Köppen, com temperatura média anual de  $23,3^{\circ}\text{C}$ . A Figura 1 mostra a precipitação média mensal nas duas regiões.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos ao acaso, em esquema fatorial  $2 \times 3$  (duas variedades e três tratamentos para disponibilização do N), com quatro repetições. As variedades testadas foram RB867515 e RB72454, enquanto os tratamentos consistiram da inoculação com bactérias diazotróficas ou da adubação com  $120 \text{ kg ha}^{-1}$  de N, além do controle experimental sem inoculação e sem adubação nitrogenada. As parcelas foram constituídas por 5 linhas de 10 m de comprimento, espaçadas a 1,10 m, na usina Cruangi, e 1,40 m, na usina Cruz Alta Guarani. Na área da usina Cruangi, a cana-de-açúcar vem sendo cultivada por aproximadamente 23 anos, com queima da palhada, e sete anos sem queima da palhada (cana crua). A área da usina Cruz Alta Guarani vinha sendo mantida sob pastagem, com diferentes espécies de gramíneas, por mais de 30 anos, e foi incorporada ao cultivo da cana-de-açúcar por ocasião da implantação do experimento.

O preparo do solo foi realizado com uma aração, duas gradagens, com incorporação de calcário dolomítico

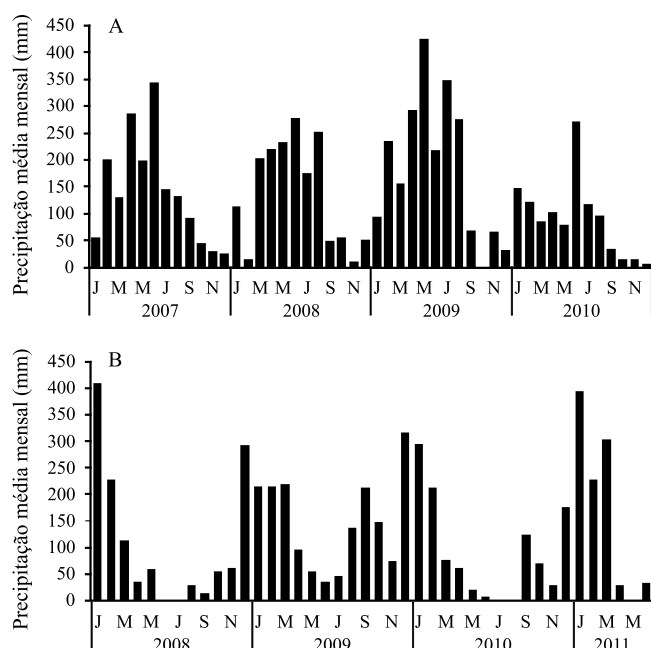
de acordo com análise de solo. Após a colheita do ciclo de cana-planta, foram realizadas análises químicas em amostras de solo das duas áreas experimentais (Tabela 1), de acordo com Donagema et al. (2011).

A adubação de rotina de plantio foi de 100 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, na forma de superfosfato simples; 120 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, na forma de cloreto de potássio; e 30 kg ha<sup>-1</sup> de FTE BR12 e 0,4 kg ha<sup>-1</sup> de molibdênio, na forma de molibdato de amônio. Após os cortes da cana-planta e da primeira soca, realizou-se adubação com 120 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, na forma de cloreto de potássio. A fonte nitrogenada utilizada no tratamento com adubação foi a ureia, na usina Cruangi, e o nitrato de potássio, na

usina Cruz Alta Guarani. Nos dois casos, as aplicações foram realizadas em dose única, com aplicação em superfície entre 2 e 3 dias após as colheitas.

O inoculante para a cana-de-açúcar foi composto por cinco estirpes de bactérias diazotróficas previamente testadas e selecionadas por Oliveira et al. (2003): *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal5<sup>T</sup>, BR11281), *Azospirillum amazonense* (Cbamc, BR11145), *Herbaspirillum seropedicae* (HRC54, BR11335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (HCC103, BR11504) e *Bulkholderia tropica* (PPE8<sup>T</sup>, BR 11366). Para a obtenção do inoculante, as bactérias foram repicadas da Coleção de Bactérias Diazotróficas da Embrapa Agrobiologia (sigla BR) e cultivadas de forma individual em meio de cultura Dyg's (Rodrigues Neto et al., 1986). Na sequência, 75 mL de meio de cultura Dyg's, com população de 10<sup>9</sup> células mL<sup>-1</sup> de cada estirpe, foi misturado em 175 g de turfa estéril (pH final 6,0) e acondicionada em saco plástico de 250 g de cada estirpe. Dessa forma, cada embalagem contendo as estirpes separadas pesou 250 g, sendo 175 g de turfa (veículo) e 75 g de suspensão bacteriana. A dose contendo as cinco estirpes foi de 1,25 kg.

A suspensão inoculante para a imersão dos toletes no plantio e para a inoculação das socas (reinoculação) foi preparada com a diluição de uma dose composta pelas cinco estirpes (1,25 kg), diluída em 100 L de água limpa, o que resultou na concentração de 12,5 g L<sup>-1</sup> do inoculante. Para a inoculação de plantio, os toletes com três gemas, previamente selecionados e padronizados, foram acondicionados em sacos de ráfia de acordo com a necessidade para cada sulco de plantio (15 gemas por metro), imersos por 30 min na suspensão inoculante em recipientes com capacidade para 200 L. Após a imersão, as mudas foram colocadas sob sombra por 30 min e plantadas em seguida. Nas socas, a suspensão inoculante com diluição igual à utilizada no plantio



**Figura 1.** Precipitação média mensal nas duas regiões de realização dos experimentos. A, Usina Cruangi, Fazenda Maravilha, PE; B, Usina Cruz Alta Guarani, SP.

**Tabela 1.** Características químicas dos solos das áreas experimentais avaliadas, após a colheita da cana-planta.

Camada (cm)	pH <sup>(1)</sup>	C ----- (g dm <sup>-3</sup> ) -----	N -----	Ca ----- (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ) -----	Mg -----	Al -----	V (%)	P ----- (mg dm <sup>-3</sup> ) -----	K -----
Planossolo Háptico distrófico textura média									
0–20	6,6	7,5	0,6	2,3	0,8	0,0	67	22	24
20–40	6,3	4,4	0,4	1,2	0,5	0,0	36	18	10
Argissolo Vermelho eutrófico textura argilosa									
0–25	6,1	7,5	0,7	2,1	0,7	0,0	71	22	64
25–50	6,0	6,7	0,6	1,6	0,8	0,0	62	6	26

<sup>(1)</sup>pH em H<sub>2</sub>O, no Planossolo, e em CaCl<sub>2</sub>, no Argissolo.

foi aplicada entre 2 e 3 dias após a colheita, com utilização de aplicador pulverizador costal, com jato dirigido para a base da soqueira e aplicação de 10 a 15 mL m<sup>-1</sup> da suspensão inoculante.

A produtividade de colmos foi obtida com a determinação do peso dos colmos das linhas centrais inteiras, em cada parcela, tendo-se descartado as linhas laterais como bordaduras. A pesagem dos colmos foi realizada com balança digital de 1.000 kg acoplada à moto-cana. No momento da colheita, foram coletadas amostras de folhas-bandeiras para a determinação do teor de N total e da concentração do isótopo  $^{15}\text{N}$ . No laboratório, as amostras de folhas-bandeiras foram secadas em estufa com circulação forçada, a 65 °C, até atingirem peso constante. Em seguida, foram passadas em moinho tipo Willey (2 mm) para depois serem finamente moídas em moinho de rolagem. A determinação de N foi feita segundo o método semimicro-Kjeldahl (Nogueira & Souza, 2005). A análise de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  foi feita somente nas amostras de folhas-bandeira que, segundo Boddey et al. (2001), representam a marcação isotópica de toda a planta. Após a análise do teor de N total nas folhas-bandeira, foram determinados os pesos (mg) para análise de delta ( $\delta^{15}\text{N}$ ), tendo-se dividido o valor 4 (40  $\mu$  de N total na amostra, que é a escala máxima de leitura do espectrômetro de massa da Embrapa Agrobiologia) pelo teor de N total (%), o que atende ao espectro de ação do espectrômetro de massas (Finnigan MAT, Bremen, Germany) do Laboratório de Isótopos Estáveis John M. Day, da Embrapa Agrobiologia.

O conhecimento da composição isotópica de  $^{15}\text{N}$  no N disponível é fundamental para a avaliação da FBN na cana-de-açúcar, e o cultivo em amostras do perfil do solo de espécies de plantas conhecidas não fixadoras, ou de fixação desprezível, é uma alternativa para auxiliar na compreensão do fenômeno (Ledgard et al., 1984; Urquiaga et al., 2012). Assim, desenvolveu-se um ensaio em casa de vegetação, com o cultivo de três espécies de plantas em amostras de terra coletadas nas duas áreas experimentais, para conhecer a variação da composição isotópica de  $^{15}\text{N}$  no perfil dos solos das áreas experimentais. Para tanto, foram coletadas amostras de terra em três pontos aleatórios, dentro de cada área experimental, nas camadas de 0 a 15, 15 a 30, 30 a 45 e 45 a 60 cm de profundidade.

Após a coleta, as amostras foram secadas e peneiradas em malha de 2 mm, e acondicionadas em

vasos de 500 g de capacidade, em casa de vegetação. Em cada camada de solo amostrada, foram cultivadas três espécies testemunhas não fixadoras, com quatro repetições, em delineamento experimental de blocos ao acaso. As plantas cultivadas foram sorgo (*Sorghum bicolor*), painço (*Panicum mileaceum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*). Antes da semeadura, foi realizada a correção da acidez do solo, com calagem realizada de acordo com a análise do solo, e adubação com 100 mg kg<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma de superfosfato simples, 100 mg kg<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O na forma cloreto de potássio, 20 mg kg<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio e 50 mg kg<sup>-1</sup> de FTE BR12. Não foi realizada adubação nitrogenada, uma vez que o objetivo foi avaliar a abundância natural do isótopo  $^{15}\text{N}$  do N disponível no solo.

Após a adubação, realizou-se a semeadura, tendo-se utilizado entre 6 e 10 sementes por vaso. Cada vaso foi cultivado com apenas uma espécie. As plantas foram cultivadas por aproximadamente 30 dias, quando começaram a apresentar amarelecimento das folhas, indício do esgotamento do N disponível do solo. Em seguida, as plantas foram coletadas inteiras (raízes e parte aérea), secadas, moídas, pulverizadas e analisadas da mesma forma descrita anteriormente, para as amostras de cana-de-açúcar. A distribuição do isótopo  $^{15}\text{N}$  do N disponível no solo (0 a 60 cm) foi calculada pela média ponderada do N extraído pelas plantas, por vaso (mg), em cada profundidade, e os respectivos valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , tendo-se utilizado o N acumulado nas plantas, em cada vaso (N disponível no solo), como fator de ponderação.

Os dados foram submetidos às análises estatísticas separadamente, por experimento, para verificar a distribuição normal e a homogeneidade das variâncias com uso do programa SAEG 9.1, e para realizar a análise de variância e o teste de médias com o software SISVAR 4.3. As médias foram comparadas com o teste t (LSD), a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

De modo geral, a produtividade de colmos das duas variedades foi similar nos dois locais de cultivo, com pequena superioridade na usina Cruz Alta Guarani, o que se justifica pelas melhores condições edafoclimáticas, principalmente em razão do solo.

A produtividade de colmos foi influenciada pela adubação nitrogenada, na fase de cana-planta, exceto

para a variedade RB867515, na usina Cruz Alta Guarani (Tabela 2). A inoculação não afetou nenhuma das duas variedades no ciclo de cana-planta, independentemente do local; contudo, promoveu aumento no rendimento de colmos da variedade RB72454, na segunda soca, na usina Cruangi. A resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada no ciclo de cana-planta é pouco comum, de maneira geral; no entanto, nas condições deste estudo, o resultado pode ter sido favorecido pela aplicação do fertilizante nitrogenado nos sulcos de plantio, o qual foi enterrado junto com os toletes. Na primeira soca, não houve influência dos tratamentos na produtividade de colmos das duas variedades, independentemente do local de cultivo.

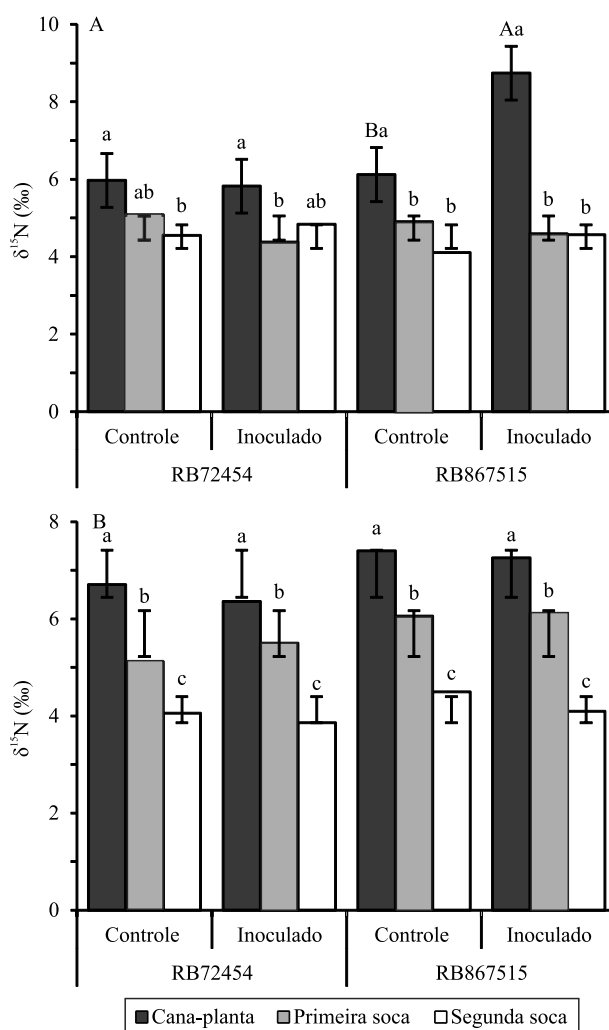
A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira da cana-de-açúcar ( $\delta^{15}\text{N}$ ) respondeu à inoculação somente na variedade RB867515, no ciclo de cana-planta, na usina Cruangi, tendo-se verificado maior valor de  $\delta^{15}\text{N}$  no tratamento inoculado, na comparação com o tratamento controle (Figura 2). Se as bactérias diazotróficas que compõem o inoculante têm capacidade de promover a FBN na cana-de-açúcar (Oliveira et al., 2006), os valores do isótopo  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira das plantas inoculadas deveriam ser inferiores aos observados no controle não inoculado (Unkovich et al., 2008). Entretanto, o oposto foi verificado neste estudo.

**Tabela 2.** Produtividade de colmos ( $\text{Mg ha}^{-1}$ ) das duas variedades de cana-de-açúcar, avaliadas por três safras consecutivas em função dos tratamentos<sup>(1)</sup>.

Tratamentos	Planossolo Háplico distrófico		Argissolo Vermelho eutrófico	
	RB72454	RB867515	RB72454	RB867515
	Cana-planta			
Controle	99,8b	123,2b	115,2b	131,4
Inoculado	100,9b	116,8b	82,7c	135,5
Adubado	125,0a	141,4a	155,0a	116,7
CV (%)	8,0		12,1	
	Primeira soca			
Controle	67,6	87,5	106,2	133,1
Inoculado	76,7	83,5	107,3	122,1
Adubado	86,9	91,5	106,1	120,1
CV (%)	19,8		8,9	
	Segunda soca			
Controle	89,1b	93,3	86,8ab	113,4
Inoculado	109,0a	93,5	73,8b	121,3
Adubado	92,3ab	92,8	94,8a	105,0
CV (%)	12,8		13,8	

<sup>(1)</sup>Médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste t, a 5% de probabilidade.

A superioridade dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  no tratamento inoculado, em comparação com o controle não inoculado, pode estar associada ao maior aproveitamento do N disponível no solo pela promoção do crescimento do sistema radicular pela inoculação (Bashan et al., 2004; Shukla et al., 2008), uma vez que os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  do N disponível no solo, extraído pelas plantas controle, foram de 11,96, 11,82, 12,25 e 11,28‰, nas camadas de 0–15, 15–30, 30–45 e 45–60 cm, respectivamente. Nessas condições, a



**Figura 2.** Valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de folhas-bandeira de cana-de-açúcar, nos ciclos de cana-planta, primeira soca e segunda soca, com e sem inoculação de bactérias diazotróficas, nas usinas Cruangi (A), PE, e Cruz Alta Guarani (B), SP. Médias seguidas de letras iguais, maiúsculas na comparação entre os tratamentos e minúscula na comparação entre safras, não diferem pelo teste t, a 5% de probabilidade.

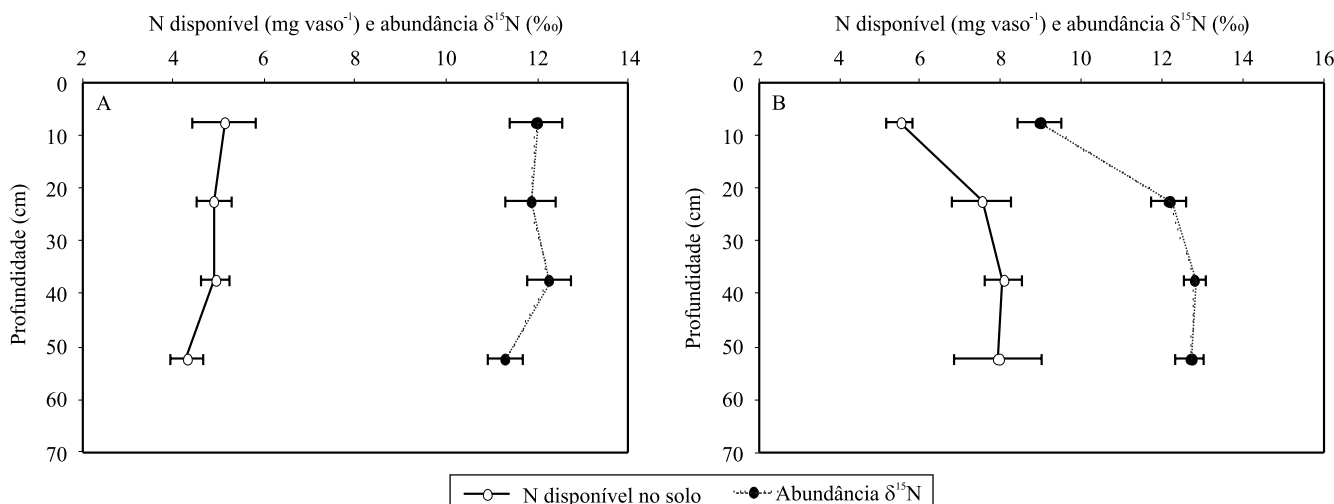
FBN naturalmente associada à cana-de-açúcar pode ter ocorrido tanto na planta não inoculada (controle) quanto na inoculada; no entanto, a diluição isotópica promovida pela FBN de forma natural possivelmente foi alterada pelo maior aproveitamento do N disponível no solo, no tratamento inoculado, que elevou os valores de  $\delta^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira para valores próximos aos observados no solo (Figura 3).

O aumento dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  na cana-de-açúcar inoculada, em relação ao controle não inoculado, para a mesma variedade (RB867515), foi observado por Schultz et al. (2012), em estudo para avaliar a eficiência do mesmo inoculante utilizado neste trabalho, nas mesmas variedades, porém em Cambissolo Flúvico na região de Campos dos Goytacazes, RJ. Similarmente ao verificado no presente estudo, os autores não relataram aumento significativo da produtividade de colmos. O aumento no crescimento do sistema radicular da variedade RB867515 inoculada foi constatado por Gírio et al. (2015), ao avaliar o crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas, com inoculação do mesmo inoculante avaliado neste estudo.

A influência da inoculação apenas para a variedade RB867515, no ciclo de cana-planta, na usina Cruangi, evidencia que o processo de FBN naturalmente associado à cana-de-açúcar se sobrepõe à introdução de bactérias via inoculação, e que faz com que o efeito

da inoculação dependa de condições específicas do cultivo e da interação planta/bactérias (Baldani et al., 2009).

A análise da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira, ao longo das três safras (Figura 2), revela que houve redução nos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  na medida em que as colheitas foram realizadas, principalmente da cana-planta para a primeira soca. Este resultado é um indicativo de que, na medida em que o solo exaure-se pelos cultivos, com redução no estoque de carbono e de N, pela mineralização da matéria do solo, a FBN naturalmente associada à cultura – que é inversamente proporcional à abundância de  $^{15}\text{N}$  – começa a se expressar de forma mais significativa. Urquiaga et al. (2012), ao avaliar o potencial produtivo da cana-de-açúcar em um Argissolo Amarelo distrófico, após 15 anos sem adubação com N fertilizante e remoção completa da palhada nas colheitas, verificaram comportamento similar ao observado no presente estudo no que se refere à redução da abundância natural do isótopo  $^{15}\text{N}$  nas plantas ao longo do tempo. Os autores concluíram ainda que houve significativo balanço positivo de N no sistema solo-planta após o período avaliado. A presença de bactérias endofíticas fixadoras de  $\text{N}_2$  atmosférico nos diferentes tecidos da cana-de-açúcar está bem descrita na literatura (Baldani et al., 2009), com relato de contribuições que podem variar desde zero a 70% do total de N acumulado ao



**Figura 3.** Nitrogênio disponível e variação da abundância de  $\delta^{15}\text{N}$  (‰) no perfil do solo Planossolo Háplico distrófico da Usina Cruangi, em Pernambuco (A), e no Argissolo Vermelho eutrófico da Usina Cruz Alta Guarani, em São Paulo (B), determinado com o uso de plantas controle cultivadas em vasos, em amostras de terra provenientes das áreas experimentais. As barras representam o erro-padrão da média.

longo ciclo da cultura (Yoneyama et al., 1997; Boddey et al., 2001; Urquiaga et al., 2012), de acordo com o genótipo e as condições edafoclimáticas.

A Figura 3 mostra a variação do N disponível no perfil do solo, até 60 cm de profundidade, bem como a variação isotópica de  $\delta^{15}\text{N}$  extraído pelas plantas controle. No Planossolo Háplico, de textura arenosa, ocorreu distribuição aproximadamente uniforme do N disponível, da superfície até 40 cm de profundidade. Já no Argissolo Vermelho, de textura argilosa, houve aumento expressivo do N disponível nos primeiros 20 cm do perfil, e esses valores mantêm-se altos em profundidade. A influência da textura do solo na distribuição do isótopo  $^{15}\text{N}$  ao longo de seu perfil limita, em muitos casos, a interpretação dos resultados de FBN na cana-de-açúcar. Segundo Ledgard et al. (1984) essas variações podem superestimar ou subestimar a real contribuição da FBN para a cana-de-açúcar. Boddey et al. (2001) afirmam que, apesar da desuniformidade do isótopo  $^{15}\text{N}$  no perfil do solo, sua variação temporal é insignificante, ou seja, há estabilidade ao longo dos anos. Conforme a premissas desses autores, pode-se inferir que a redução da composição isotópica de  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira da cana-de-açúcar, ao longo dos anos, é resultante do empobrecimento do solo e do aumento da eficiência da FBN natural associada à cultura, que dessa forma garantiria os níveis de produtividade e longevidade dos canaviais, o que não é observado em outras culturas de interesse econômico que não contam com a contribuição eficiente do processo de FBN.

### Conclusões

1. As variedades RB72454 e RB867515 apresentam baixos índices de respostas à adubação nitrogenada e à inoculação com bactérias diazotróficas.

2. Nas condições deste estudo, o inoculante não influencia de forma significativa a abundância natural de  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira da cana-de-açúcar.

3. A abundância natural de  $^{15}\text{N}$  nas folhas-bandeira diminui ao longo das colheitas, o que indica que a fixação biológica do nitrogênio, naturalmente associada à cultura, aumenta na medida em que o N disponível no solo exaure-se com o cultivo.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, CT-Agro projeto no. 558329/2009-8), pelo apoio financeiro; e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (Faperj), pela bolsa cientista.

### Referências

- BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R. dos S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOGUEIRA E.M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E.B.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G. de; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S.; BODDEY, R.M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família da Poaceae (antiga gramineae). **Tópicos em Ciência do Solo**, v.6, p.204-271, 2009.
- BAPTISTA, R.B.; MORAIS, R.F. de; LEITE, J.M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Variations in the  $^{15}\text{N}$  natural abundance of plant-available N with soil depth: their influence on estimates of contributions of biological  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**, v.73, p.124-129, 2014. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.08.008.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L.E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p.521-577, 2004. DOI: 10.1139/w04-035.
- BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of the  $^{15}\text{N}$  natural abundance technique for the quantification of the contribution of  $\text{N}_2$  fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.889-895, 2001.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v.15, p.211-216, 1961. DOI: 10.1007/BF01400455.
- DONAGEMA, G.K.; CAMPOS, D.V.B. de; CALDERANO, S.B.; TEIXEIRA, W.G.; VIANA, J.H.M. (Org.). **Manual de métodos de análise do solo**. 2.ed. rev. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2011. 230p.
- GÍRIO, L.A. da 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, p.33-43, 2015. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000100004.
- LEDGARD, S.F.; FRENEY, J.R.; SIMPSON, J.R. Variations in natural enrichment of  $^{15}\text{N}$  in the profiles of some Australian Pasture Soils. **Australian Journal of Soil Research**, v.22, p.155-164, 1984. DOI: 10.1071/sr9840155.
- NOGUEIRA, A.R. de A.; SOUZA, G.B. de (Ed.). **Manual de laboratório: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 313p.

- OLIVEIRA, A.L.M. de; CANUTO, E. de L.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.59-61, 2003. DOI: 10.1590/S1517-83822003000500020.
- OLIVEIRA, A.L.M. de; CANUTO, E.L. de; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. Yield of micropropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v.284, p.23-32, 2006. DOI: 10.1007/s11104-006-0025-0.
- PEREIRA, W.; LEITE, J.M.; HIPÓLITO, G. de S.; SANTOS, C.L.R. dos; REIS, V.M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, p.363-370, 2013. DOI: 10.1590/S1806-66902013000200020.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR, V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *Citri* tipo B. **Suma Phytopathologica**, v.12, p.16, 1986.
- SANTOS, H.G. dos; JACOMINE, P.K.T.; ANJOS, L.H.C. dos; OLIVEIRA, V.A. de; OLIVEIRA, J.B. de; COELHO, M.R.; LUMBRERAS, J.F.; CUNHA, T.J.F. (Ed.). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2013. 306p.
- SCHULTZ, N.; SILVA, J.A. da; SOUSA, J.S.; MONTEIRO, R.C.; OLIVEIRA, R.P.; CHAVES, V.A.; PEREIRA, W.; SILVA, M.F. da; REIS, V.M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.38, p.359-371, 2014. DOI: 10.1590/S0100-06832014000200005.
- SCHULTZ, N.; MORAIS, R.F. de; SILVA, J.A. da; BAPTISTA, R.B.; OLIVEIRA, R.P.; LEITE, J.M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J.B.; ALVES, B.J.R.; BALDANI, J.I.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. Avaliação agronômica de duas variedades de cana de açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.261-268, 2012. DOI: 10.1590/S0100-204X2012000200015.
- SHUKLA, S.K.; YADAV, R.L.; SUMAN, A.; SINGH, P.N. Improving rhizospheric environment and sugarcane ratoon yield through bioagents amended farm yard manure in *udic ustochrept* soil. **Soil and Tillage Research**, v.99, p.158-168, 2008. DOI: 10.1016/j.still.2008.02.007.
- UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: Australian Centre for International Agricultural, 2008. 258p. (ACIAR monograph, 136).
- URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F. de; BATISTA, R.B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J.M. e; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A.S. de; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data of the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v.356, p.5-21, 2012. DOI: 10.1007/s11104-011-1016-3.
- VITTI, A.C.; CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O.; ROSSETO, R. Nitrogênio. In: DINARDO-MIRANDA, L.L.; VASCONCELOS, A.C.M. de; LANDELL, M.G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. p.239-269.
- VITTI, A.C.; FRANCO, H.C.J.; TRIVELIN, P.C.O.; FERREIRA, D.A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C.E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.287-293, 2011. DOI: 10.1590/S0100-204X2011000300009.
- YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.H.; DACANAY, E.V.; NAKANISHI, Y. The natural <sup>15</sup>N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako, Japan. **Plant and Soil**, v.189, p.239-244, 1997. DOI: 10.1023/A:1004288008199.

---

Recebido em 25 de agosto de 2015 e aprovado em 23 de dezembro de 2015