

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR
CENTRO REGIONAL DE CIÊNCIAS NUCLEARES DO NORDESTE**

Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CANA-DE-AÇÚCAR CULTIVADA
EM DIFERENTES CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DO NORDESTE
BRASILEIRO**

ANDREA AVELINO DA SILVA

Orientadora: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Recife, PE
2017

ANDREA AVELINO DA SILVA

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares para obtenção do título de Doutora em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Área de Concentração: Aplicações de Radioisótopos na Agricultura e meio ambiente.

Orientadora: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Recife, PE
2017

Catálogo na fonte

Bibliotecário Carlos Moura, CRB-4 / 1502

S586f Silva, Andrea Avelino da.

Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em diferentes condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro. / Andrea Avelino da Silva. - Recife: O Autor, 2017.

69 f. : il., tabs.

Orientadora: Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares, 2017.

Inclui referências bibliográficas.

1. *Sacharum* spp. 2. Técnicas isotópicas. 3. Micro-organismos endofíticos. 4. Abundância natural. I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orientadora. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovada em:

18/12/2017

Orientadora:

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas – DEPA/UFRPE

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Everardo Valadares de Sá Barretto Sampaio (DEN/UFPE)

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos (DEPA/UFRPE)

Dr. Dário Costa Primo (DEN/UFPE)

Dr. Vinicius Santos Gomes da Silva (CECA/UFAL)

Visto e permitida a impressão

Coordenador(a) do PROTEN/UFPE

Oração do Poder de Deus

Deus, dê-me toda a força e poder, dá-me hoje segurança do teu amor e a certeza de que estás comigo. Peço-te ajuda e proteção para o dia de hoje porque preciso de tua assistência e de tua misericórdia. Tira de mim o medo que me invade, tira de mim a dúvida que me perturba. Esclarece o meu espírito abatido com a luz que iluminou o caminho do teu divino filho Jesus Cristo, aqui na terra. Que eu possa Senhor, perceber toda a tua grandeza e a tua presença em mim.

Sopra o teu espírito dentro de minha alma para que eu sinta o meu interior fortalecido com a tua presença, minuto a minuto, hora a hora, dia após dia. Que eu sinta a tua voz dentro de mim e ao meu redor e em minhas decisões que perceba qual a tua vontade.

Que eu sinta o teu maravilhoso poder através da força, da oração e com este poder, a minha pessoa seja atingida pelo milagre que podes realizar a meu favor, suavizando os meus problemas, acalmando o meu espírito, aumentando a minha fé.

Não me abandones. Oh! Senhor Jesus fica comigo para que eu não me desespere e nem te esqueça. Levanta o meu espírito quando o encontrares abatido. Ajuda-me a seguir-te sem vacilar e sem olhar para trás. Entrego-te neste dia toda a minha vida e a vida de toda a minha família. Livra-nos de todo mal que possa estar dirigido a nós, ainda que seja por milagre, sei Senhor, que vai me atender porque me amas e me escutas amorosamente.

Te agradeço, meu Deus e meu Pai e embora esteja com a alma inquieta te suplico! Dá-me o poder de aceitar acima de tudo, que se cumpra em mim a tua vontade e não a minha. Assim seja.

“Pai do céu dai-me forças
Jesus Cristo me dai poder
Maria Santíssima me dai coragem
Para essa batalha eu vencer
Sem morrer
Sem me abater
Sem o juízo perder”

“Nada temas, porque estou contigo, não lances olhares desesperados, pois eu sou o teu Deus; eu te fortaleço e venho em teu socorro, eu te amparo com minha destra vitoriosa” (Is 41, 10)

A Deus,

Ofereço

Aos meus pais Marlene Maria Avelino e
Amaro Severino da Silva; minha irmã
Marilia Avelino da Silva; minha avó paterna
Josefina Maria da Silva e meus avós
maternos Severino André Avelino e Helena
Maria Avelino,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao término de minha pós-graduação ao nível de Doutorado, tenho três palavras para demonstrar meu sentimento: **GRATIDÃO, SUPERAÇÃO E APRENDIZADO.**

GRATIDÃO:

A Deus, pelo dom da vida e por ter oportunizado a concretização deste sonho e desta etapa em minha formação.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), em especial ao Departamento de Energia Nuclear (DEN) e ao Programa de Pós-graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares (PROTEN), pela oportunidade do curso de doutorado.

Ao povo brasileiro e à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Aos meus pais Amaro Severino da Silva e Marlene Maria Avelino e minha irmã Marília Avelino da Silva pelo apoio incondicional e estímulo, por sempre terem acreditado em mim e por nunca terem medido esforços e fazerem por onde eu chegar até aqui. A minha querida vovó materna Helena Maria Avelino que mesmo sem ser alfabetizada também me incentiva em meus estudos dizendo “Deus vai lhe ajudar na sua leitura, porque Deus é maior!” e aos meus familiares que direta ou indiretamente me incentivaram na minha caminhada estudantil.

A minha orientadora do Doutorado, Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas, pela acolhida, paciência e pelo exemplo de profissionalismo e competência que representa para mim. Registro minha admiração por sua dedicação mesmo na “tripla jornada” de ser filha e mãe e ainda se dedicar à formação de seus orientandos. Também à sua “fiel escudeira” Dra. Carolina Etienne Santos, por todo apoio ao longo de meu Doutorado. Fica minha admiração às duas por provarem que existem sim amizades verdadeiras na vida profissional em meio a tantas concorrências desnecessárias.

Ao comitê de acompanhamento: Dr. Djalma Euzébio Simões Neto, Dra. Carolina Etienne Santos e Prof. Everardo Sampaio, por terem aceitado me acompanhar durante esta jornada e pela colaboração na melhoria deste trabalho. Ao Dr. Eric Carvalho, pelas sugestões do 2º seminário, e à banca examinadora da Tese, pelas colaborações.

À minha amiga desde o ensino médio, a psicóloga Diana Lima, por ter indicado a psicoterapeuta Judy D’Assumpção Torres que me auxilia no meu autoconhecimento e me faz enxergar todas as coisas que me afligem sob um novo olhar, agradeço por ser essa profissional fantástica. Sou grata também a Judy por indicar a sua filha Déborah Marchesin, facilitadora das terapias de constelação sistêmica familiar, as quais sempre me ajudam a renovar meu equilíbrio emocional. Também a terapeuta floral Deuzuwilma Galvão, por sempre me auxiliar na medida certa do que preciso.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) pelo apoio estrutural deste trabalho; aos meus colegas da Pós-graduação em Ciência do Solo; ao professor Brivaldo Almeida, pelo espaço no Laboratório de Física do Solo para a realização das análises granulométricas, e à técnica de laboratório Emillany Borges, por toda ajuda e amizade construída durante este processo.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), nas pessoas de Dra. Maria do Carmo Catanho e Dra. Adália Mergulhão, pela realização das análises químicas dos solos.

A todas as instituições envolvidas nas coletas de campo deste trabalho:

- ✓ Estação de Cana de Açúcar do Carpina (EECAC/UFRPE): Dr. Djalma Euzébio e ao Engenheiro Agrônomo Msc. Evanilson Silva
- ✓ Usina Serra Grande Alagoas: Engenheiros Agrônomos Edivaldo Ximenes (gerente de planejamento e produção) e Miguel Teixeira de Alencar (gerente agrícola), por terem proporcionado a realização das coletas; ao técnico agrícola Josivan Luiz, por toda atenção e ajuda na realização das amostragens; a Graciliane Ximenes, por todo o carinho, apoio e atenção oferecidos durante a permanência na Usina e às “meninas do escritório” do Departamento Agrícola, Ana Maria Francelino e Tanykele Lins, pela acolhida e disponibilidade

- ✓ Usina Trapiche S/A: Engenheiro Agrônomo José Aluizio Tavares e técnico agrícola Eduardo José Oliveira
- ✓ Agroindústria do Vale do São Francisco (Agrovale): aos Engenheiros Agrônomos Dr. Paulo Pedro da Silva e Francisco Celestino (superintendente agrícola).
- ✓ A todos os trabalhadores rurais das respectivas unidades, pela contribuição inestimável para que nós pudéssemos realizar nosso trabalho.

Ao grupo dos “Dolorianos do DEN”: Benaia Barros, Renata Janaína, Reginaldo Neto, Edilândia Dantas e Anderson Vasconcelos, companheiros de jornada acadêmica. Um agradecimento especial a Reginaldo Neto pela preciosa ajuda nas coletas na EECAC e na Agrovale.

A todos os atuais alunos ou que passaram pelo grupo Energia da Biomassa durante o curso de doutorado pelo companheirismo e ajuda sempre disponível; à equipe técnica do Laboratório de Energia da Biomassa: Claudenice Maria, Gilberto Eloi e Pedro José e ao Dr. Dário Primo pela assistência prestada nos trabalhos de laboratório.

Aos colaboradores (funcionários) do Departamento de Energia Nuclear com os quais fiz amizade.

Às amigas Lidiane Gomes Batista, Jane Kelly Silva Araújo, Krystal Notaro, Tânia Lúcia da Costa e Benaia Barros, pelo apoio de sempre no decorrer do meu Doutorado. Às amigas do Mestrado no CECA/UFAL (Alagoas): Ana Cristina Nascimento dos Santos, pela amizade e por sempre estar de braços e de portas abertas para me receber e hospedar na sua casa em Juazeiro-BA em todas as vezes que precisei fazer as coletas, e Simone Silva da Costa, que foi aluna do Doutorado no CECA/UFAL e que na sua temporada de seu curso no Recife servíamos de apoio uma à outra.

Aos meus amigos de fé da turma de Engenheiros Agrônomos de 2009.2 da UFRPE: Mauricéa Fidelis, Anderson Santos, Karime Soares, Nivea Maria, Renata Medeiros, Izeudo Ramos, Wagner Araújo, Flávio Costa e Abioséias Marinho, por sempre estarem comigo mesmo que distantes fisicamente. Também à “Equipe de Lanche” do ensino médio: Miriam Félix, Sônia Santos, Tatiana Costa e Antônio Acioli, por todo incentivo.

À música, que sempre esteve presente em minha vida (em especial o canto) e ao Coro da UFRPE, que literalmente “fez Doutorado” comigo.

À dança do ventre, ao frevo, à academia de ginástica, aos livros Philia (Pe. Marcelo Rossi) e “Cara a cara com alguém especial” (Eliana Barbosa), por me fazerem superar desafios além das minhas limitações físicas, por me ajudarem na minha autoestima e amenizar o transtorno de ansiedade.

Às professoras Dra. Maria do Socorro Bezerra de Araújo (DCG/CFCH/UFPE) e Dra. Izabel Cristina de Luna Galindo (DEPA/UFRPE), por terem me aceitado como estagiária de docência e pelo aprendizado na convivência de ambas.

A todos que me ajudaram de forma direta ou indireta, mesmo com uma palavra de conforto, de incentivo.

SUPERAÇÃO dos fatos de:

Ter acolhido desafios ao longo do curso, reconhecido e aceitado minha condição de fragilidade e ter buscado melhoria;

Não desistir quando tudo concorria para tal e, mesmo diante da fragilidade, não deixar de cumprir com minhas responsabilidades perante o Doutorado;

Ser resiliente em meio a situações extremas, ter espírito elevado e encarar as dificuldades e os acontecimentos desagradáveis como aprendizado.

APRENDIZADO:

Por meu autoconhecimento e maturidade pessoal e profissional;

A ser paciente quando não acontecia o esperado;

A lutar e correr atrás dos meus objetivos para alcançar metas;

A compreender que não existe um padrão, que para cada um de nós existe um tempo, um momento, uma história (não fazendo apologia à estagnação ou acomodação) mas sim ao respeito próprio.

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma cultura de extrema importância como fonte de energia renovável, apresentando grande impacto no contexto social e econômico no Brasil. É uma gramínea que apresenta um alto potencial de interação com bactérias diazotróficas, podendo se beneficiar da fixação biológica de nitrogênio (FBN). O objetivo deste trabalho foi estimar a FBN em cana-de-açúcar, cultivada em diferentes condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro, e o efeito de doses crescentes de fertilizante nitrogenado sobre a FBN na cultura. Os estudos foram realizados em quatro regiões produtoras de cana-de-açúcar, nos estados de Pernambuco, Alagoas e Bahia. Em Pernambuco, foram realizadas amostragens em plantios localizados na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, EECAC (município de Carpina, Zona da Mata Setentrional) e na Usina Trapiche (município de Sirinhaém, Zona da Mata Meridional). Em Alagoas, foram amostrados plantios na Usina Serra Grande (município de São José da Laje, região de transição Zona da Mata/Agreste). Na Bahia, foram amostrados plantios de cana-de-açúcar pertencentes a Agroindústria do Vale do São Francisco (Usina Agrovale), localizados no município de Juazeiro (no Vale São-Franciscano, Sertão). Em cada local, foram coletadas folhas diagnóstico (+3) de diferentes indivíduos de diferentes variedades de cana-de-açúcar, além de folhas de plantas de não fixadoras de N de ocorrência natural nos canaviais ou em áreas adjacentes, para serem utilizadas como referência na estimativa da FBN pela metodologia da abundância natural do ^{15}N . Devido à dificuldade para encontrar uma planta com características de absorção de N do solo semelhantes às da cana-de-açúcar, foi conduzido um experimento auxiliar para a determinação da variação do sinal do $\delta^{15}\text{N}$ do N do solo disponível para as plantas, na camada de 0 a 60 cm de profundidade. Neste experimento, foram cultivadas quatro espécies de plantas de referência não fixadoras de N, em amostras de solo coletadas em cada local estudado nas profundidades de 0,0-0,20 m, 0,20-0,40 m e 0,40-0,60 m. Além disso, foi realizada uma amostragem de tecido foliar de cana-de-açúcar (variedade VAT90-212) em um experimento na Usina Agrovale, para avaliar o efeito de doses crescentes de fertilizante nitrogenado (na forma nitrato de amônio) sobre a abundância natural de ^{15}N . A cana-de-açúcar foi considerada como capaz de absorver N atmosférico, por meio do processo de FBN, quando se apresentou significativamente empobrecida em ^{15}N em relação às médias das referências. Essa situação foi observada no levantamento em campo em quatro variedades coletadas no município de Carpina e em três variedades coletadas no município de São José da Laje. Em relação à variação do sinal do $\delta^{15}\text{N}$ em profundidade foi constatado que ocorreu um enriquecimento do sinal isotópico em função da profundidade do solo em todos os locais. Quanto a estimativa da FBN em doses crescentes de fertilizante nitrogenado no Semiárido, as mesmas não exerceram efeito de redução do $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes doses aplicadas.

Palavras-chave: *Sacharum* spp. Técnicas isotópicas. Micro-organismos endofíticos.

Abundância natural

ABSTRACT

A sugarcane is a culture of extreme importance as a source of renewable energy, presenting large impact on social and economic context in Brazil. It is a grass that has a high potential for interaction with diazotrophic bacteria, can benefit from the biological nitrogen fixation (BNF). The objective of this study was to estimate the BNF in sugarcane, grow in different climatic conditions of the Brazilian Northeast, and the effect of increasing doses of nitrogen fertilizer on a BNF in culture, by means of their isotopic composition. The studies were carried out in four regions of sugarcane, in the states of Pernambuco, Alagoas and Bahia. In Pernambuco, samplings were carried out in plantations located at the Experimental Station of sugarcane in the Carpina, EECAC (municipality of Carpina, Zona da Mata North) and in the Usina Trapiche (municipality of Sirinhaém, Zona da Mata Meridional). In Alagoas, plantations were sampled in the Usina Serra Grande (municipality of São José da Laje, transition region of Zona da Mata/Agreste). In Bahia, were sampled plantations of sugar cane belonging to agribusiness do Vale do São Francisco (Agrovale Plant), located in the municipality of Juazeiro in the valley are Franciscan, Sertão). In each location, leaves were collected diagnosis (+3) of different individuals from different varieties of sugar cane, in addition to leaves of plants not fixing N of natural occurrence in the cane fields or in adjacent areas, to be used as a reference in the estimate of the BNF by methodology of natural abundance of ^{15}N . Due to the difficulty to find a plant with absorption characteristics of N from the soil similar to sugar cane, an experiment was conducted to determine the signal variation of $\delta^{15}\text{N}$ of N from the soil available to plants, on the layer 0 to 60 cm depth. In this experiment, were grown in four species of plants of reference fixing N in soil samples collected at each site studied at depths of 0.0-0.20 m and 0.20-0.40 m and 0,40-0,60 m. In addition, it was performed a sampling of leaf tissue of sugar cane (variety VAT90-212) in an experiment in Usina Agrovale, to evaluate the effect of increasing doses of nitrogen fertilizer (in the form of ammonium nitrate) on the natural abundance of ^{15}N . Sugar cane was regarded as able to absorb atmospheric N, through the process of BNF, when was significantly depleted in ^{15}N in relation to the averages of the references. This situation was only observed in the field survey for only four varieties collected in the municipality of Carpina. In relation to the signal variation of $\delta^{15}\text{N}$ in depth was observed that there was an enrichment of isotopic signal in function of soil depth in all locations. As the estimation of BNF in increasing doses of nitrogen fertilizer in the semi-arid, they do not have the effect of reducing the $\delta^{15}\text{N}$ in different doses applied.

Key-words: *Sacharum* spp. Isotopic techniques. Endophytic micro-organisms. Natural abundance

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características edafoclimáticas dos locais onde foram realizados os estudos	31
Tabela 2 - Variedades de cana-de-açúcar (no ciclo de primeira soca), plantas referência e produtividade agrícola durante a safra 2014/2015 na Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), Carpina-PE.....	32
Tabela 3 - Variedades de cana-de-açúcar no ciclo de primeira soca, plantas referência e produtividade agrícola da Usina Trapiche	34
Tabela 4 - Amostragens de variedades de cana-de-açúcar e plantas referência na Usina Serra Grande, São José da Laje, AL	35
Tabela 5 - Amostragens de variedades de cana-de-açúcar e plantas referência na Usina Agrovale, Juazeiro-Bahia	37
Tabela 6 - Resumo Informações dos plantios comerciais das áreas de estudo.....	38
Tabela 7 - Análises químicas e físicas dos solos em profundidade das áreas dos plantios comerciais de cana-de-açúcar em quatro unidades canavieiras nos municípios de Carpina-PE, Sirinhaém-PE, São José da Laje-AL e Juazeiro-BA	40
Tabela 8 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar, plantas não fixadoras de N e estimativas da proporção de N derivado da atmosfera (%N _{da}) em cana-de-açúcar cultivada na Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina (EECAC/UFRPE), aos 10 e oito meses após a 1ª rebrota durante o ciclo da cana-soca	45
Tabela 9 - Valores médios de %N, $\delta^{13}\text{C}$, %C e relação C/N em cinco variedades de cana de açúcar aos 10 e oito meses após a 1ª rebrota (1ª soca) e três plantas de referência coletadas na Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina (EECAC/UFRPE)	47
Tabela 10 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰), N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N de folhas +3 (folhas verde) em quatro variedades de cana-de-açúcar e plantas não fixadoras de N cultivadas na Usina Trapiche, aos 10 meses após a 1ª rebrota durante o ciclo de cana-soca.....	49
Tabela 11 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ em folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar e plantas de referência cultivadas na Usina Serra Grande (São José da Laje, Alagoas) nos ciclos de cana-planta e cana-soca aos 10 e 14 meses após o plantio e 1ª rebrota, respectivamente	52
Tabela 12 - Valores médios de N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N em folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar e plantas de referência cultivadas na Usina Serra Grande (São José da Laje, Alagoas) nos ciclos de cana-planta e cana-soca aos 10 e 14 meses após o plantio e 1ª rebrota, respectivamente	53
Tabela 13 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰), N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N em folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar e plantas de referência cultivadas na Usina Agrovale (Juazeiro, Bahia) nos ciclos de cana-planta e cana-soca aos 10 meses após o plantio e 2ª rebrota, respectivamente.....	55
Tabela 14 - Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível em profundidade em plantas referência cultivadas em vaso em solo proveniente em locais de coleta.....	56
Tabela 15 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰), %N, $\delta^{13}\text{C}$, %C e relação C/N em folhas +3 (folhas verde) na cana-soca da variedade VAT 90-212 e em plantas de referência cultivadas na dose padrão (143 kg ha ⁻¹) e em doses crescentes de N aos 7 meses após a 2ª rebrota na Usina Agrovale (Juazeiro, Bahia).....	61
Tabela 16 - Produtividade agrícola (TCH) e índices tecnológicos da cana-de-açúcar: produtividade industrial (TPH), sacarose aparente (PCC%) e açúcares totais redutores (ATR) em função das doses de N na variedade VAT 90-212 aos 7 meses após a 2ª rebrota na Usina Agrovale, Juazeiro-BA.....	62

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Localização das unidades canavieiras onde foram realizadas as coletas.....	30
Figura 2 - Precipitação pluvial na EECAC durante a safra em que foram realizadas as coletas	33
Figura 3 - Precipitação média durante o período de cultivo em que foram realizadas as coletas em campo na Usina Trapiche. Fonte: APAC	34
Figura 4 - Precipitação média durante o período de cultivo o qual foram realizadas as coletas em campo na Serra Grande. Fonte: Usina Serra Grande.....	36
Figura 5 - Experimento em casa de vegetação, com vasos cultivados com plantas de referência não fixadoras de N (girassol, algodão, mamona e capim buffel), aos 45 dias após o plantio utilizando como substrato solos de quatro diferentes locais	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 A CANA-DE-AÇÚCAR	17
2.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	18
2.3 ADUBAÇÃO NITROGENADA E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA CANA-DE-AÇÚCAR.....	19
2.4 QUANTIFICAÇÃO DA FBN EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	22
2.4.1 BALANÇO DE N.....	22
2.4.2 <i>Atividade de redução do acetileno (ARA)</i>	<i>23</i>
2.4.3 TÉCNICAS ISOTÓPICAS PARA MENSURAÇÃO DA FBN NA CANA-DE-AÇÚCAR.....	23
2.4.4 <i>Diluição Isotópica.....</i>	<i>24</i>
2.4.5 <i>Abundância Natural do ¹⁵N.....</i>	<i>26</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Descrição das áreas de estudo.....	29
3.2 AMOSTRAGEM EM PLANTIOS COMERCIAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR	31
3.3 HISTÓRICO DE CULTIVO, MANEJO E PLANTAS AMOSTRADAS NAS ÁREAS DE ESTUDO.....	32
3.3.1 ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CARPINA	32
3.3.2 USINA TRAPICHE, SIRINHAÉM-PERNAMBUCO	33
3.3.3 <i>Usina Serra Grande, São José da Laje-Alagoas</i>	<i>35</i>
3.3.4 <i>Usina Agrovale, Juazeiro-Bahia.....</i>	<i>37</i>
3.4 Preparação e determinações nas amostras vegetais	39
3.5 Amostragem de solo.....	39
3.6 Estimativa da FBN.....	41

3.7 Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível para as plantas de acordo com a profundidade do solo	42
3.7 Estimativa da FBN em cana-de-açúcar cultivada sob diferentes níveis de adubação nitrogenada	43
3.8 Análises estatísticas	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 Abundância natural do ¹⁵ N nos plantios comerciais de cana-de-açúcar	45
4.1.1 EECAC, Carpina – Pernambuco	45
4.1.2 Usina Trapiche, Sirinhaém-Pernambuco	48
4.1.3 Usina Serra Grande, São José da Laje - Alagoas	51
4.1.4 Usina Agrovale, Juazeiro-Bahia	54
4.2 Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível para as plantas de acordo com a profundidade do solo	55
4.3 Abundância natural de ¹⁵ N, produtividade e variáveis tecnológicas em cana-de-açúcar cultivada sob diferentes níveis de adubação nitrogenada no semiárido	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., família Poaceae) exerce um papel de grande importância na economia de diversos países, sendo de maior destaque nas economias da América Latina e do Caribe (COELHO et al., 2003). É uma das melhores opções dentre as fontes de energia renováveis atuais, com grande importância no cenário agrícola brasileiro e um futuro promissor no cenário mundial (MAULE; MAZZA; MARTHA JR., 2001), por possuir um elevado potencial para a produção de biomassa e adaptabilidade a diversas condições edafoclimáticas (ZAMBROSI et al., 2015).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e possui uma ampla distribuição da produção no seu território. Na 2016/2017, até o quarto levantamento da feito pelo Companhia Nacional de Abastecimento CONAB (2017), até o mês de abril do referido ano foram processadas cerca de 657 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, o que permitiu uma estimativa de produção de 38,7 milhões de toneladas de açúcar e 27,8 bilhões de litros de etanol. Toda essa produção foi prevista para uma área de plantio estimada de 9,05 milhões de hectares, alcançando produtividades médias de 76,2 ton ha⁻¹. Na Região Nordeste foi estimada uma produção total de 47 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, numa área de 904,6 mil hectares.

Entre os nutrientes mais exigidos pela cana-de-açúcar, o nitrogênio (N) e destaca-se pela importância na nutrição e fisiologia da planta, pois, dentre outras funções, é constituinte das proteínas e dos ácidos nucleicos (Malavolta et al., 1989) e muitos outros importantes constituintes celulares, incluindo membranas e hormônios vegetais (SOUZA & FERNANDES, 2006). Na agricultura moderna, o N é o principal fator limitante da produtividade das culturas, e a utilização de fertilizantes químicos (sobretudo os nitrogenados) vem aumentando nas últimas décadas (GOVINDARAJAN et al., 2006). Fertilizantes nitrogenados, dependentes de energia fóssil para sua produção, são caros e seu uso indiscriminado pode trazer prejuízos econômicos e ambientais, o que levou a busca de alternativas mais sustentáveis. Considerando o custo econômico e ambiental dos adubos nitrogenados, são fundamentais a compreensão do processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) e o desenvolvimento de manejos adequados da adubação nitrogenada que visem ao melhor aproveitamento do N pela cultura da cana-de-açúcar (FRANCO et al., 2008).

Um aspecto interessante do cultivo de cana no Brasil é que, em comparação com os cultivos de outros países que têm rendimentos semelhantes, a utilização de fertilizantes

nitrogenados ainda é baixa. De acordo com Urquiaga et al. (2012), em países como a Índia, EUA, Colômbia e Austrália, o fertilizante nitrogenado é adicionado entre 150 e 200 kg N ha⁻¹ano⁻¹, enquanto que no Brasil as aplicações variam entre 60 e 80 kg ha⁻¹ano⁻¹ de N. Em relação à resposta da cana-de-açúcar ao nitrogênio, alguns autores relatam que a cana-planta não é responsiva, enquanto que nas socas a aplicação se faz necessária e altera muito o retorno do N de acordo com o tipo de manejo e de solo envolvidos (GAVA et al., 2001). Basanta et al. (2003) e Franco et al. (2011) constataram que a quantidade de N acumulada na biomassa aérea da cana está muito acima das doses de fertilizante nitrogenado aplicado, sugerindo que a entrada da FBN para o sistema é uma das prováveis razões que explicam porque o nitrogênio é utilizado em menor quantidade na cana-de-açúcar brasileira (CANTARELLA; ROSSETTO, 2014).

Os isolamentos pioneiros de bactérias fixadoras de N₂ (ou diazotróficas) associadas à cana-de-açúcar geraram o conceito de que a planta poderia se beneficiar com aportes de N por meio deste processo e um grande interesse por isolamentos de novos micro-organismos. Entretanto, ainda não está estabelecido se, e em que extensão, as gramíneas se beneficiam do N fixado pelos diazotróficos endofíticos ou se os benefícios são devidos à produção de ácido indol-3-acético (AIA) e outras substâncias promotoras de crescimento que, comprovadamente, provocam alterações morfológicas na raiz (como o aumento das raízes laterais e dos pelos radiculares), aumentando a absorção de nutrientes (ALVES et al., 2015; BENEDUZI et al., 2013; STEENHOUDT; VANDEREYDEN, 2000; VIDEIRA et al., 2012).

Para a cana-de-açúcar são fortes as evidências de que diversas variedades plantadas no país são capazes de obter parte do N acumulado em sua biomassa proveniente da atmosfera, embora em proporções bastante variáveis (BAPTISTA et al., 2014; POLIDORO et al., 2001; URQUIAGA et al., 2012), o que explicaria sua produção com quantidades de fertilizantes nitrogenados muito inferiores às aplicadas em outros países. Entretanto, as informações disponíveis não cobrem grande parte da diversidade de genótipos utilizados e de condições ambientais das diferentes regiões produtoras. Resultados encontrados em outros países são contraditórios; por exemplo, resultados demonstram que algumas variedades cultivadas no Uruguai (TAULÉ et al., 2012) também podem obter quantidades consideráveis de N atmosférico, mas para a cana-de-açúcar cultivada na Austrália (BIGGS et al., 2002) e na África do Sul (HOEFSLOOT et al., 2005), não foram encontradas evidências de FBN.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi determinar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em variedades comerciais de cana-de-açúcar, cultivadas em diferentes regiões produtoras do Nordeste do Brasil, e o efeito de doses crescentes de fertilizante nitrogenado sobre a abundância natural de ^{15}N em cana cultivada no Semiárido, como subsídio para estimar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) na cultura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (família Poaceae, gênero *Saccharum*) foi introduzida no Brasil por volta de 1500, trazida pelos portugueses. É uma gramínea perene, que perfilha de maneira abundante, apresentando colmos de formato cilíndrico, folhas alternadas e opostas aderidas ao colmo, sistema radicular de arquitetura variável de acordo com a idade da planta, e com o ciclo (corte) e inflorescência, que é indesejável para o cultivo comercial, entretanto, importante para o melhoramento genético da cultura (FIGUEIREDO, 2010). É uma espécie capaz de crescer em ampla faixa de habitats e altitudes, adaptando-se a diferentes ambientes.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia, China, Tailândia, Paquistão e México (MARQUES, 2009; AHMED et al., 2014). Sua produtividade é regulada por diversos fatores de produção, dentre os quais se destacam: planta (variedade), solo (propriedades químicas, físicas e biológicas), clima (umidade, temperatura, insolação), práticas culturais (controle da erosão, plantio, erradicação de plantas invasoras, descompactação do solo), controle de pragas e doenças, colheita (maturação, corte, carregamento e transporte), etc. (ORLANDO FILHO et al. 1994). Porém, de acordo com Trivelin et al. (2002) esta cultura sofre algumas limitações que não estão relacionadas à radiação solar, à temperatura ou mesmo à água, mas sim à disponibilidade de quantidades adequada de nutrientes no solo, com destaque para o nitrogênio.

Os principais derivados da cana-de-açúcar são o açúcar, que se subdivide em cristal, mascavo e demerara entre outros, e etanol, sendo este anidro (misturado à gasolina) ou hidratado (utilizado como combustível comercial). Além disso, de acordo com Ferreira et al. (2016) a biomassa também pode ser aproveitada e o bagaço representa uma importante fonte de energia, que pode ser utilizada para geração de eletricidade, produção de vapor para as caldeiras e como matéria-prima para a segunda geração de etanol produzido por hidrólise enzimática.

2.2 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um nutriente fundamental para todos os seres vivos e pode ser tão limitante quanto a água para o crescimento e a produtividade das plantas. Na natureza, o principal repositório de nitrogênio é a atmosfera. Embora a maior parte (78%) da composição da atmosfera terrestre seja representada pelo nitrogênio, existente na forma do gás N_2 , esse imenso compartimento não está disponível para a maioria dos vegetais, que dependem do N da matéria orgânica do solo ou da adição de fertilizantes nitrogenados (SANTOS et al., 2008).

De acordo com Reis et al. (2006), a estabilidade do gás N_2 é devida à presença de uma forte ligação tríplice, que a maioria dos organismos animais e vegetais não conseguem quebrar. Para que o N possa ser absorvido pelas plantas, é necessário que esteja na forma iônica (NH_4^+ ou NO_3^-). A fixação espontânea dá-se através da ação de raios. A fixação industrial, na qual ocorre a queima de combustíveis fósseis a temperaturas muito elevadas (em torno de 300 a 400°C), que fornece a energia necessária para a reação do hidrogênio com o nitrogênio atmosférico para formar amônia (processo de Haber-Bosh), é utilizada diretamente na produção de fertilizante nitrogenado (KERBAUY, 2004). Na fixação biológica, a reação de redução do N_2 a NH_3 é realizada por alguns organismos procariontes que possuem a enzima nitrogenase e são conhecidos como fixadores de N_2 ou diazotróficos. Eles podem ser de vida livre, estar associados a espécies vegetais ou, ainda, estabelecer simbiose com as plantas (MOREIRA et al., 2010).

A FBN é muito estudada e difundida, sobretudo nas plantas leguminosas. De acordo com Santos et al. (2008), as plantas dessa família podem conseguir uma parte ou a totalidade de sua nutrição nitrogenada diretamente do ar, devido às suas associações de simbiose com bactérias específicas (genericamente denominadas de rizóbios). Essas bactérias invadem os pelos radiculares formando nódulos, que são estruturas especializadas para o processo biológico, formadas nas raízes das leguminosas, onde o nitrogênio livre do ar é convertido em nitrogênio para assimilação ou estocagem pela planta. Após a formação dos nódulos nas raízes, a bactéria passa a fixar o nitrogênio atmosférico em compostos orgânicos que são utilizados pelas plantas o que potencialmente pode suprir parte da demanda de N, minimizando e/ou diminuindo o uso de fertilizantes nitrogenados industrializados (POLIDORO et al., 2001; HUNGRIA et al. 2007; MENDES et al., 2010).

Uma prática bastante utilizada para aumentar a eficiência da FBN em plantas é a inoculação de bactérias diazotróficas para que sejam alcançadas maiores produtividades. Dessa forma, diminui-se bastante a quantidade de fertilizante mineral aplicado e conseqüentemente, o produtor economiza. De acordo com Mendes et al. (2010), a inoculação é um processo no qual bactérias fixadoras de nitrogênio são adicionadas à semente antes da semeadura e é realizada com o inoculante que é um produto que contém micro-organismo com ação benéfica para o desenvolvimento das plantas.

Ainda que as maiores contribuições da FBN tenham sido detectadas em oceanos e plantas leguminosas, algumas plantas da família Poaceae (antiga família Gramineae) têm mostrado potenciais bastante significativos de FBN. No caso específico da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, esses ganhos são bastante expressivos, podendo gerar uma economia potencial de cerca de 200 milhões de reais por ano, se for considerado que o processo de FBN pode contribuir com cerca de 65% do N acumulado pela cultura (REIS et al., 2006).

2.3 Adubação nitrogenada e fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar

Devido à importância econômica da agroindústria sucroalcooleira e à extensão da área plantada com cana-de-açúcar no país, tem havido interesse pela investigação de fatores que permitam alcançar a máxima eficiência de utilização de fertilizantes nitrogenados pela cultura em diferentes condições, aliando-se produtividade à redução nas perdas de nitrogênio do solo por volatilização de amônia, lixiviação de nitrato ou desnitrificação (BENDASSOLLI; TRIVELIN; IGNOTO, 2002)

O nitrogênio é importante na nutrição e fisiologia da cana-de-açúcar, pois, dentre outras funções, é constituinte das proteínas e dos ácidos nucleicos (MALAVOLTA et al., 1989).

Os fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo sofrem uma série de transformações químicas e microbianas, que podem resultar em perdas para os vegetais. Nesse contexto, considerando o custo dos adubos nitrogenados, é fundamental o desenvolvimento de manejos adequados da adubação nitrogenada que visem ao melhor aproveitamento do N pela cultura (FRANCO et al., 2008).

Quanto à resposta da cana ao nitrogênio, muitos trabalhos concluem que a cana-planta não responde a este nutriente. Em cana-planta têm sido verificadas baixas respostas à adubação nitrogenada, diferente do que acontece em cana-soca, na qual as respostas à

adubação nitrogenada são mais frequentes com percentual acima de 90% (OLIVEIRA et al. 2007). Alguns fatores têm sido listados para explicar as baixas respostas da cultura ao nitrogênio aplicado no plantio, entre os quais a mineralização da matéria orgânica do solo e dos restos culturais da própria cana e as perdas de nitrogênio do adubo por lixiviação (CANTARELLA et al., 2007). A baixa resposta também têm sido atribuída às perdas de N no plantio, à alta imobilização do N no solo e ao maior vigor do sistema radicular comparado com os das socarias (COURTAILLAC et al., 1998, TRIVELIN et al., 2000).

Franco et al. (2011) não observaram respostas à adubação nitrogenada na produção de biomassa da variedade SP81-3250 (cana-planta) em Pirassununga, SP com doses que variaram de 40 até 120 t ha⁻¹ de N. Porém, com a mesma variedade no ciclo de cana-soca, em Jaboticabal, SP, foi observado aumento de biomassa até a dose de 80 kg ha⁻¹ de N.

Alguns estudos de adubação nitrogenada em cana-de-açúcar demonstram que essa cultura responde com maior produção de colmos e rendimento de açúcar e que essa adubação, associada à incorporação de resíduos culturais ao solo, faz com que a planta utilize maior quantidade total de N (TRIVELIN et al., 2002), principalmente a partir da segunda soca, quando a fertilização propicia, possivelmente, a recomposição do vigor da soqueira (VITTI et al., 2007).

Após a revolução verde, grandes aumentos na produção agrícola foram permitidos pelo desenvolvimento de genótipos de plantas altamente responsivos aos adubos químicos. O nitrogênio é o principal fator limitante da produtividade das culturas e, com os preços de fertilizantes químicos mais acessíveis, quantidades cada vez maiores de fertilizantes têm sido utilizados nas últimas décadas. Mas fertilizantes nitrogenados são caros e ecologicamente inseguros, o que levou a busca de alternativas. Entre elas, o uso da fixação biológica de nitrogênio (GOVINDARAJAN et al., 2006).

As pesquisas sobre FBN em gramíneas no Brasil foram iniciadas por Johanna Döbereiner, quando ela ingressou durante a década de 1950 na equipe de pesquisa do Centro Nacional de Ensino e Pesquisa Agrícola do Ministério da Agricultura (BALDANI; BALDANI, 2005). Os primeiros estudos foram sobre a ocorrência de *Azotobacter* em solos ácidos na “Baixada Fluminense” e estes trabalhos ganharam mais visibilidade com a descoberta de novas bactérias fixadoras de nitrogênio associadas à rizosfera de algumas gramíneas: *Beijerinckia fluminensis*, em cana-de-açúcar, e *Azotobacter Paspali*, em *Paspalum notatum* cv. Batatais. Apesar disso, a pesquisa sobre fixadores de N₂ (diazotróficos) associativos no Brasil só foi intensificada a partir da descoberta de novas

espécies de *Azospirillum* (Döbereiner, 1978), que coincidiu com a chamada “crise do petróleo”, despertando o interesse por alternativas biológicas aos fertilizantes utilizados na agricultura.

A FBN na cana-de-açúcar já foi comprovada por estudos envolvendo diferentes técnicas utilizando o isótopo ^{15}N e revela um quadro promissor (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Reis et al. (2006) afirmaram estudos baseados no balanço do N comprovaram a contribuição de diferentes espécies de bactérias diazotróficas (destacando-se *Azospirillum spp.*, *Herbaspirillum spp.*, *Gluconacetobacter diazotrophicus* e *Burkholderia spp.*) em culturas como arroz, milho, sorgo, trigo e cana-de-açúcar, entre outras (BALDANI; BALDANI, 2005; BALDANI et al., 2009; MONTAÑEZ et al., 2012). Estes microorganismos proporcionam potencial favorável na associação com as gramíneas, utilizando-se em ensaios de laboratório (inoculação, testes *in vitro*), casa de vegetação e em campo com diferentes espécies de plantas para avaliação da atuação da interação planta-bactéria (FARIAS et al., 2012). Entretanto, a forma como ocorre a transferência do N fixado para as gramíneas ainda não foi determinada. Soma-se a isso a inexistência de uma estrutura especializada semelhante aos nódulos, dificultando o estudo dessas associações e a determinação da real contribuição de cada mecanismo na melhoria da nutrição das plantas.

Alguns trabalhos têm demonstrado a eficiência da FBN na cultura da cana-de-açúcar. Um exemplo disso foi o trabalho de Oliveira et al. (2003) com duas variedades de cana s (SP70-1143 e SP81-3250) inoculada, nas quais foi observado que, após 17 meses de crescimento no campo, a produtividade e a contribuição da FBN foram influenciadas pelo genótipo da planta e tipo de solo e a maior contribuição da FBN foi observada em solos pobres, para ambas as variedades. Uma possível explicação para as diferenças varietais, segundo Reis Junior et al. (2000), seria o fato de que as variedades apresentariam características distintas em relação à população de bactérias endofíticas. Schultz et al. (2014), estudando a resposta de duas variedades de cana-de-açúcar (RB72454 e RB867515) à inoculação com cinco bactérias diazotróficas promotoras de crescimento, nos ciclos de cana-planta e soca, verificaram que a variedade RB86-7515 foi responsiva tanto à adubação nitrogenada quanto à inoculação das estirpes bacterianas na segunda soqueira, ao passo que a variedade RB72454 não foi influenciada pela inoculação.

Além da fixação de N, a cana-de-açúcar pode obter outros benefícios com a interação com bactérias diazotróficas como o crescimento radicular, melhorando a

absorção da água e nutrientes do solo. A interação cana-de-açúcar/bactéria diazotrófica é importante porque permite à cana absorver o nitrogênio da atmosfera (FBN). Esta fixação resulta em economia significativa na utilização do fertilizante nitrogenado, representando ganhos financeiros e ambientais com a diminuição dos impactos da produção de fertilizante nitrogenado, um processo que demanda alto consumo de combustíveis fósseis.

2.4 Quantificação da FBN em cana-de-açúcar

Algumas técnicas são utilizadas para quantificar a FBN na cana-de-açúcar, dentre as quais as mais empregadas são o balanço de N, a redução do acetileno e as técnicas isotópicas empregando ^{15}N (diluição isotópica e abundância natural de ^{15}N).

2.4.1 Balanço de N

A técnica do balanço de N total no sistema solo-planta consiste em quantificar o N-total contido no perfil do solo, até a profundidade de influência das raízes das plantas no início e no final do experimento, contabilizando-se também o N-total acumulado e exportado do campo pelas plantas na colheita a cada ano (URQUIAGA et al., 2003). Para isso, é necessário estimar o N total no solo, semente e outros insumos, como adubos, desde o início do crescimento até a colheita e novamente, ao final, quantificar o N total na planta e no solo (REIS et al., 2006). Diminuindo-se o valor inicial do final, tem-se o balanço de N. Entretanto, além da baixa sensibilidade (REIS et al., 2006), as medidas da fixação do N_2 podem ser subestimadas devido às perdas de N do sistema através da volatilização de amônia, desnitrificação, lixiviação, ou confundidos por outros insumos externos de N que não sejam relacionados à fixação do N_2 (por exemplo, N dissolvido em precipitação, em poeira, ou gases) (PEOPLES et al., 1989; BODDEY et al., 1995; HERRIDGE et al.; 2008). Tal fato faz com que as estimativas de perdas por estes processos não sejam incluídas no balanço total de N_2 (UNKOVICH et al., 2008).

Esta técnica tem sido aplicada em cana-de-açúcar para quantificar a FBN por longos períodos. Xavier (2006) estudou a FBN em 10 variedades de cana-de-açúcar por 15 anos utilizando o balanço de nitrogênio no solo em profundidade e verificou que das 10, quatro variedades (SP 70-1143, SP 79-2312, SP 71-6163 e Krakatau) obtiveram contribuição da FBN de 424,5 kg de N ha^{-1} , em média.

De acordo com Unkovich et al. (2008), esta técnica tem a vantagem de ser de simples aplicação e de baixo custo e o fato de permitir a mensuração de cultivos de cana onde não existe nenhum dado de contribuição da FBN. Entretanto, o balanço de N é uma

técnica por vezes dispendiosa, pelo fato de que necessita de longos períodos de avaliação para que sejam obtidas estimativas da fixação de N_2 .

2.4.2 Atividade de redução do acetileno (ARA)

Os primeiros esforços para medir a contribuição da FBN utilizaram um inibidor competitivo da enzima nitrogenase, que uma vez na atmosfera, era reduzido preferencialmente: o acetileno (REIS et al., 2006). Nesse método, substitui-se parte da atmosfera por acetileno, que é reduzido a etileno e medido em um cromatógrafo a gás. O princípio dessa metodologia é quantificar o etileno formado durante a incubação de amostras de solo ou de raízes noduladas ou não, com acetileno dentro de recipientes hermeticamente fechados a temperaturas entre 20 e 30°C (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). De acordo com Boddey et al. (2007), esta técnica possui vantagens como uso de materiais simples e não muito dispendiosos, a análise rápida, o que permite muitas determinações por dia e alta sensibilidade para a análise da nitrogenase. Porém, de acordo com Unkovich et al. (2008), possui a limitação de mensurar a atividade da nitrogenase apenas até o ensaio.

2.4.3 Técnicas isotópicas para mensuração da FBN na cana-de-açúcar

Embora todos os métodos tenham suas limitações e fontes de erro, as técnicas isotópicas comprovadamente representam as melhores metodologias disponíveis atualmente para estimar a FBN, por apresentarem maior confiabilidade nos resultados. Duas técnicas bastante utilizadas são a de diluição isotópica e a da abundância natural do ^{15}N .

As técnicas isotópicas partem do princípio de que qualquer material existente na natureza que possua nitrogênio em sua constituição apresenta uma proporção de 0,366% de átomos de ^{15}N em relação ao total de N, que em sua maioria (99,6337%) é composto do isótopo ^{14}N (ALVES et al., 2005). Assim, se uma planta cresce utilizando N de duas fontes (exemplo: solo e fertilizante), e uma delas for artificialmente enriquecida com ^{15}N , é possível determinar a contribuição de cada uma para a nutrição da planta. De acordo com Boddey et al. (1995), as técnicas isotópicas apresentam capacidade de discriminar e

quantificar diretamente a fonte de N utilizada pela planta além de serem as que melhor se aplicam para a estimativa da FBN em culturas não leguminosas.

Ambas as metodologias necessitam de plantas de referência que, de acordo com Xavier (2006), são plantas de crescimento e comportamento geral semelhante à espécie objeto do estudo, se possível de mesma família e não fixadora, que possibilite uma amostragem do enriquecimento do ^{15}N disponível no solo. Na escolha dessa planta de referência algumas considerações devem ser levadas em conta: possuir um crescimento semelhante ao da planta-teste e ter um sistema radicular que explore as mesmas camadas de solo (REIS et al., 2006).

A seleção da planta de referência é um passo importante na exatidão das mensurações da FBN em cana-de-açúcar, devido ao fato de que existem muitas variações da espécie escolhida para pesquisas e a possibilidade de os resultados serem subestimados, ocasionado pela dificuldade de identificar espécie com o mesmo comportamento da cana-de-açúcar sem que sejam potenciais fixadoras. De acordo com Alves & Zotarelli (2005), uma planta de referência ideal seria aquela em que a única diferença da planta teste fosse a incapacidade de obter contribuições da FBN.

Uma ocorrência que têm limitado a utilização das técnicas isotópicas é o fato de que têm um alto custo, pois necessitam de um espectrômetro de massa, que é um equipamento caro e pouco disponível nas instituições de pesquisa em países em desenvolvimento como o Brasil. A utilização deste equipamento oferece alta precisão e a capacidade de medição de diferenças muito pequenas na concentração de ^{15}N .

2.4.4 Diluição Isotópica

A técnica da diluição isotópica é vista como uma das mais confiáveis, uma vez que, se cuidadosamente utilizada, permite estimar a proporção do N da planta que foi obtido via FBN durante todo o ciclo da cultura (VIERA-VARGAS et al., 1995). É baseada na alteração da proporção natural entre os isótopos ^{15}N e ^{14}N , acrescentando-se ao substrato das plantas a serem testadas adubos nitrogenados artificialmente enriquecidos (proporção de átomos de $^{15}\text{N} > 0,3663 \%$) em proporção conhecida, ou seja, adubos marcados (XAVIER, 2006)

Para aplicar esta técnica no campo considera-se como condição básica que tanto a planta alvo quanto a planta de referência sejam cultivadas no mesmo solo marcado com ^{15}N e sob condições de manejo similares, pois a técnica pressupõe que o enriquecimento

de ^{15}N do N disponível no solo para a planta testemunha é igual ao N extraído do solo pela planta alvo desde o início do crescimento (URQUIAGA et al. 1992), ou seja: as plantas alvo e as de referência necessitam apresentar condições semelhantes de crescimento e ter um sistema radicular que explore as mesmas camadas de solo. Se as plantas alvo apresentarem absorção diferencial do ^{15}N ao longo do tempo e espaço explorado pelas raízes, terão marcação diferente, introduzindo assim um erro na estimativa da contribuição da FBN (REIS et al., 2006).

A uniformidade da marcação de ^{15}N do N disponível do solo para as plantas é um dos pressupostos para a utilização da técnica de diluição isotópica de ^{15}N para quantificação da FBN, desde que as plantas testemunhas tenham enraizamento e marcha de absorção de N no solo similares aos da planta em avaliação (UNKOVICH et al., 2008). Sugestões apresentadas por Baldani et al. (2009) para contornar o problema de variação do enriquecimento do ^{15}N do N disponível do solo ao longo do tempo com diferentes estratégias de marcação do solo entre elas a aplicação fracionada do fertilizante e uso de vasos ou tanques de concreto preenchidos com solo marcado, com dimensões que representam bem o crescimento normal das plantas em campo. Esta estratégia tem um alto custo, porém permite que as quantificações de FBN sejam mais exatas. No Brasil, Urquiaga et al. (1992) quantificaram a contribuição da FBN em diferentes variedades de cana utilizando esta técnica em plantas cultivadas em vasos de concreto preenchidos com solo uniformemente marcado com ^{15}N e verificaram que as variedades de cana obtiveram menor enriquecimento de ^{15}N , porém com maior quantidade de N acumulado.

Esta técnica tem demonstrado contribuições significativas da FBN em plantas não leguminosas, como milho no Uruguai, evidenciando contribuições significativas de FBN nesta cultura (MONTAÑEZ et al., 2009). Taulé et al. (2011) estudando a contribuição da FBN em cana-de-açúcar pela técnica da diluição isotópica, também no Uruguai, observaram que algumas variedades apresentaram entradas significantes de N por meio da FBN (34,8 a 58,8% de nitrogênio derivado da fixação atmosférica - Ndfa).

Esta técnica demanda um investimento consideravelmente elevado com o fertilizante marcado e necessita da condição de uniformidade, ou seja que as condições de enriquecimento do ^{15}N sejam semelhantes até a profundidade onde as raízes extraem o N para sua nutrição.

2.4.5 Abundância Natural do ^{15}N

Esta técnica é baseada na diferença da abundância natural de ^{15}N entre as plantas fixadoras e as plantas que obtém N somente do solo, consideradas como plantas de referência (não-fixadoras) (VALLES-DE LA MORA et al. 2003) . A diferença entre a diluição isotópica e a abundância natural do ^{15}N é que na abundância natural a marcação do solo acontece naturalmente, diferente da diluição isotópica em que é necessário que se utilize solo com o nitrogênio marcado, ou seja não é baseada no enriquecimento, mas sim no valor natural do ^{15}N na planta e no solo (VALLES-DE LA MORA et al. 2003).

Esta técnica apresenta algumas vantagens: não há necessidade de adição de N marcado, evitando os problemas de inibição da fixação de N e de estabilidade da marcação ao longo do tempo (SHEARER & KOHL et al., 1986), não necessita de perturbações no ambiente, ou seja: nada precisa ser acrescentado ou destruído, é utilizado o ambiente natural (HÖGBERG, 1997).

No entanto, um problema relacionado aos estudos com a técnica de abundância natural de ^{15}N para a cana-de-açúcar tem sido a falta de uma variedade de cana adequada ou uma planta não fixadora a ser considerada como testemunha de porte equivalente (por exemplo, capim-elefante, *Pennisetum purpureum*), para servir como uma não fixadora de ^{15}N ou planta de referência (BAPTISTA et al., 2014). É importante selecionar uma planta controle que explore um volume de solo e absorva nutrientes num padrão de tempo semelhante ao da planta alvo (espécie fixadora), ou seja, é importante que as plantas controle e alvo tenham fenologias e hábitos de crescimento semelhantes (FREITAS et al. 2010)

Em um levantamento da FBN em cana-de-açúcar realizado em áreas do nordeste e sudeste brasileiro, Polidoro et al., (2001) observaram que o uso da técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) foi sensível e mostrou-se adequada para a quantificação da contribuição da FBN, e possivelmente em outros cultivos agrícolas cuja lavoura não receba aplicação de elevadas doses de fertilizante nitrogenado. As proporções de N fixadas variaram entre 0 e 60%, com média de 32%. Um destaque relevante nesse trabalho foi que os autores encontraram fixação de N não apenas em cana-planta mas também nas socarias sendo as variedades RB 72454 e SP 801842 as que apresentaram maior potencial para FBN nos cultivos amostrados.

Yoneyama et al. (1997) estudaram a contribuição da FBN para a cana-de-açúcar utilizando a técnica da abundância natural no Brasil, Filipinas e Japão com amostras

foliares comparadas às plantas-referência adjacentes à cana. Eles constataram que em muitos locais, especialmente no Brasil, as plantas de referência mostraram níveis de abundância de ^{15}N mais elevados que as folhas de cana, sugerindo que ocorreram contribuições da FBN. Nas Filipinas e no Japão, embora tenham sido aplicados fertilizantes químicos incluindo N, ocorreram significativas contribuições de fixação de N_2 .

Urquiaga et al. (2012) verificaram a contribuição da FBN para nove variedades de cana-de-açúcar utilizando o balanço de N e a técnica de abundância natural de ^{15}N em experimentos de campo em Seropédica, RJ. Mostraram um balanço positivo de N (acima de $60 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$), observaram que os valores de ^{15}N das amostras de folha de cana-de-açúcar foram menores do que o das plantas de referências, e que houve uma contribuição de N derivado da FBN variando de 29 a 68% nas variedades comerciais.

Em contrapartida, Biggs et al. (2002), estudando a abundância natural do ^{15}N em 12 locais de plantios comerciais e um ensaio de campo na Austrália, observaram que nos canaviais comerciais australianos a fixação de N_2 não é uma fonte importante de N. No ensaio de campo, no qual a cana foi comparada com plantas-referência (gramíneas e leguminosas) o $\delta^{15}\text{N}$ foi positivo, semelhante ou maior que as gramíneas e leguminosas (ou seja: o valor do ^{15}N nas plantas referência foi menor, o que indica que não ocorreu a contribuição da FBN na cana australiana). Na África do Sul, Hoefsloot et al. (2005) verificando a FBN em plantas de cana inoculadas com bactérias endofíticas também não encontraram nenhuma evidência de contribuições da FBN das variedades de cana estudadas.

Coelho et al. (2003) realizaram um estudo para identificar genótipos de cana-de-açúcar (comerciais e silvestres) com potencial de receber contribuição da FBN através da técnica de abundância natural do ^{15}N e concluíram que o processo de FBN contribuiu de forma significativa para a nutrição nitrogenada das plantas de cana-de-açúcar, permitindo produtividades elevadas de forma sustentável, mesmo quando a lavoura foi cultivada em solos de baixa disponibilidade de N para as plantas.

De acordo com Xavier (2006), estudos auxiliares em profundidade são necessários para se ter maior segurança nas estimativas de FBN pelo fato de que por essa técnica isotópica, diferenças na abundância natural do ^{15}N em profundidade podem refletir em diferenças entre as plantas de cana-de-açúcar e referências, sem que a FBN esteja, de fato, contribuindo para o sistema, bastando para isso que as plantas de referência empregadas

no estudo utilizem N das camadas do solo em proporções diferentes daquelas para cana-de-açúcar.

A abundância natural do ^{15}N é uma técnica promissora em relação à quantificação da FBN em gramíneas pelo fato de a coleta ser relativamente fácil, não necessitar de grande esforço e mão-de-obra e também por não se fazer uso de fertilizante marcado, o que diminui o trabalho e o custo. Porém, a ausência de equipamentos de espectrômetro de massa disponíveis para determinar a abundância natural de ^{15}N das amostras para análise traz uma certa dificuldade de se realizar trabalhos utilizando esta técnica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição das áreas de estudo

Os estudos foram realizados em Pernambuco, Alagoas e Bahia (Figura 1), em quatro regiões produtoras de cana-de-açúcar, com características edafoclimáticas distintas (Tabela 1). Em Pernambuco, foram realizadas amostragens em plantios localizados na Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, EECAC (município de Carpina, Zona da Mata Setentrional) e na Usina Trapiche (município de Sirinhaém, Zona da Mata Meridional). Em Alagoas, foram amostrados plantios na Usina Serra Grande (município de São José da Laje, região de transição Zona da Mata/Agreste). Na Bahia, foram amostrados plantios de cana-de-açúcar pertencentes a Agroindústria do Vale do São Francisco (Usina Agrovale), localizados no município de Juazeiro (no Vale São-Franciscano, Sertão). Na Usina Agrovale também foi realizado um experimento com o objetivo de avaliar a fixação biológica de nitrogênio em plantios de cana-de-açúcar submetidos a doses crescentes de nitrogênio tendo como fonte nitrato de amônio.

Figura 1- Localização das unidades canaveiras onde foram realizadas as coletas

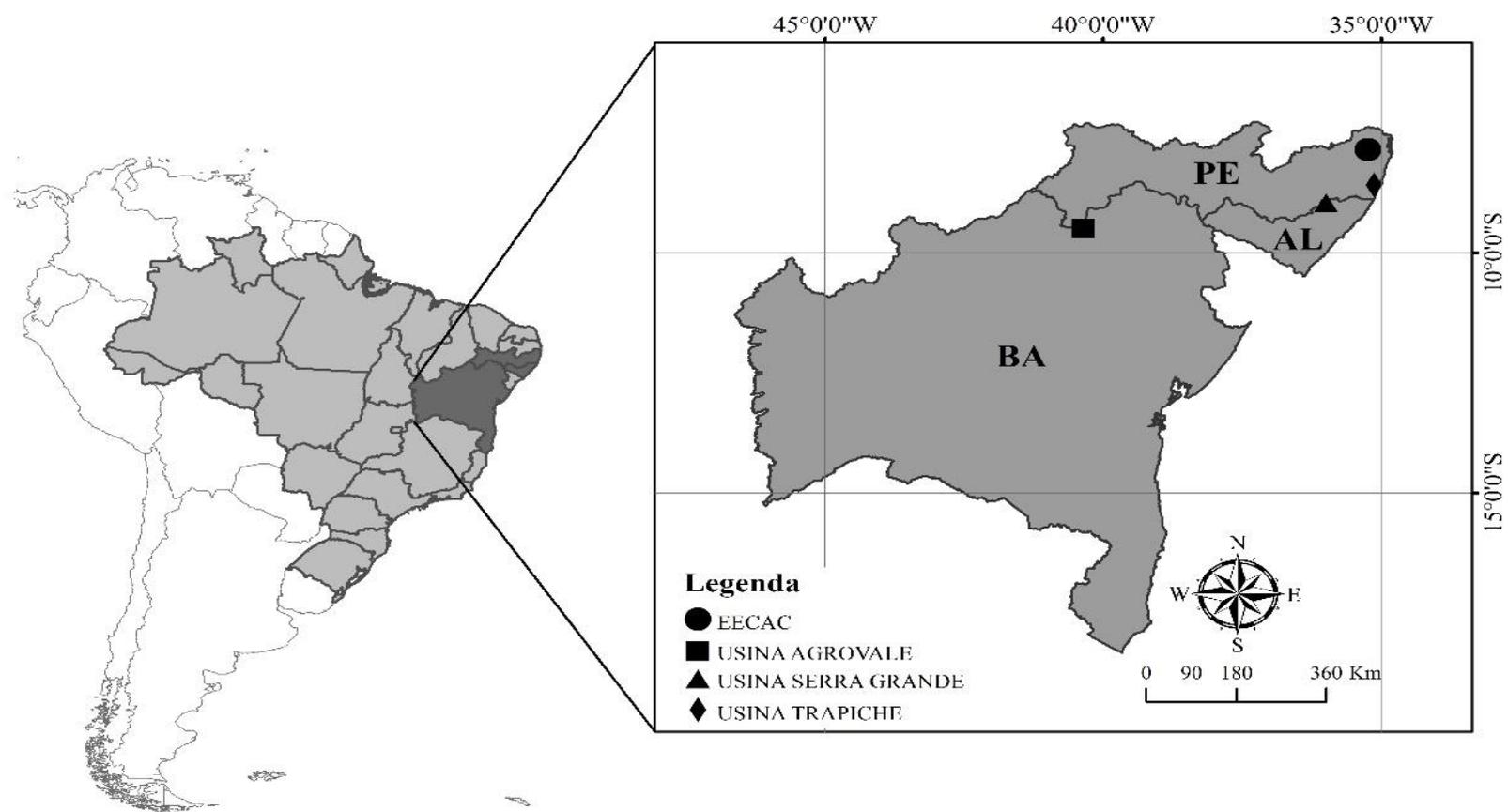


Tabela 1- Características edafoclimáticas dos locais onde foram realizados os estudos

Localização	Solo e relevo	Clima (Köppen)	Precipitação média anual (mm)
EECAC/Carpina-PE 7° 51' 13'' S 35° 14' 10'' W 180 m de altitude	Argissolo. Relevo suave ondulado	Ams, tropical chuvoso de monção, com verão seco. Temperatura média anual 24 °C	1.082
Usina Trapiche/Sirinhaém-PE 8° 35' 27'' S, 35° 06' 58'' W 48 m de altitude	Argissolo e Latosolo Relevo forte ondulado	As Tropical chuvoso com verão seco Temperatura média anual 26 °C	2.445
Usina Serra Grande/São José da Laje-AL 9° 00' 36'' S 36° 03' 28'' W 256 m de altitude	Argissolo vermelho- amarelo e Latosolo vermelho distófico; Relevo suave ondulado.	As, tropical com chuvas de outono- inverno. Estação seca bem definida Temperatura média anual 26 °C	1.305
Agrovale/Juazeiro-BA 9° 28' 07'' S 40° 22' 43'' W 395 m de altitude	Vertissolo Relevo plano	BSh', Semiárido quente, com escassez de chuvas; e temperaturas médias de 24 °C	399 (irrigado)

3.2 Amostragem em plantios comerciais de cana-de-açúcar

Em cada local, foram coletadas diferentes variedades de cana-de-açúcar prioritariamente as mais utilizadas nos plantios comerciais, incluindo cana planta e socas, em diferentes talhões nos plantios comerciais das unidades canavieiras estudadas. Na escolha de variedades em cada talhão, foram coletadas, de maneira aleatória, amostras compostas de folhas índice (+3) de cinco plantas de cana-de-açúcar. De acordo com cuja a concentração de ^{15}N corresponde à da planta inteira (BODDEY et al. (2001). As plantas foram coletadas com cerca de 10 meses quando atingem o máximo do perfilhamento e competição, chegando ao estande final (RODRIGUES, 1995) sempre procurou-se coletar variedades comuns entre as áreas na própria unidade canavieira e entre aos demais locais de coleta.

Em todos os sistemas estudados, também foram amostradas folhas de plantas espontâneas, crescendo entre as linhas de cana ou em áreas adjacentes aos canaviais, para

estimar o sinal de ^{15}N do N do solo disponível para as plantas. Estas plantas foram identificadas ao nível de espécie pelo Herbário do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco).

3.3 Histórico de cultivo, manejo e plantas amostradas nas áreas de estudo

3.3.1 Estação experimental de cana-de-açúcar do Carpina

A Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina foi criada pelo governo federal através do IAA (Instituto do Açúcar e Álcool) na década de 60 e está localizada na Zona da Mata Setentrional de Pernambuco, distante 60 km do Recife. Com a extinção do Planalsucar (Plano Nacional de Melhoramento de Cana-de-Açúcar) em 1990, a Estação passou a ser administrada pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. O plantio de cana-de-açúcar foi iniciado há mais de 50 anos na estação. As coletas foram realizadas em cinco pontos que apresentam relevo plano. As variedades de cana-de-açúcar e as plantas referências coletadas na EECAC estão listadas na tabela 2.

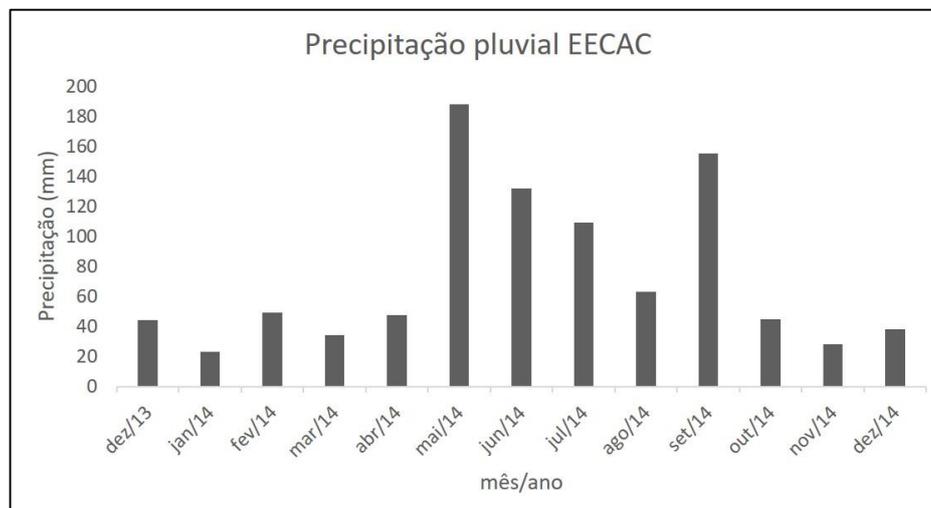
Tabela 2 - Variedades de cana-de-açúcar (no ciclo de primeira soca), plantas referência e produtividade agrícola durante a safra 2014/2015 na Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina (EECAC), Carpina-PE

Variedade	Plantas referência	Produtividade agrícola (TCH) ton ha ⁻¹
RB863129		60
RB 867515	<i>Richardia grandiflora</i>	60
RB 92579	<i>Scolparia dulcis</i>	80
RB 962962	<i>Conyza sumatrensis</i>	70
RB 931011*		50

*Cana-soca coletada aos 8 meses de idade

O plantio é prioritariamente de sequeiro (figura 2), porém, aplica-se irrigação de salvação com três lâminas de 21 mm. Após o corte, o solo da área é umedecido (se estiver muito seco), para facilitar a rebrota. A produtividade agrícola média relacionada à safra na qual foram realizadas as coletas está na tabela 3.

Figura 2 - Precipitação pluvial na EECAC durante a safra em que foram realizadas as coletas



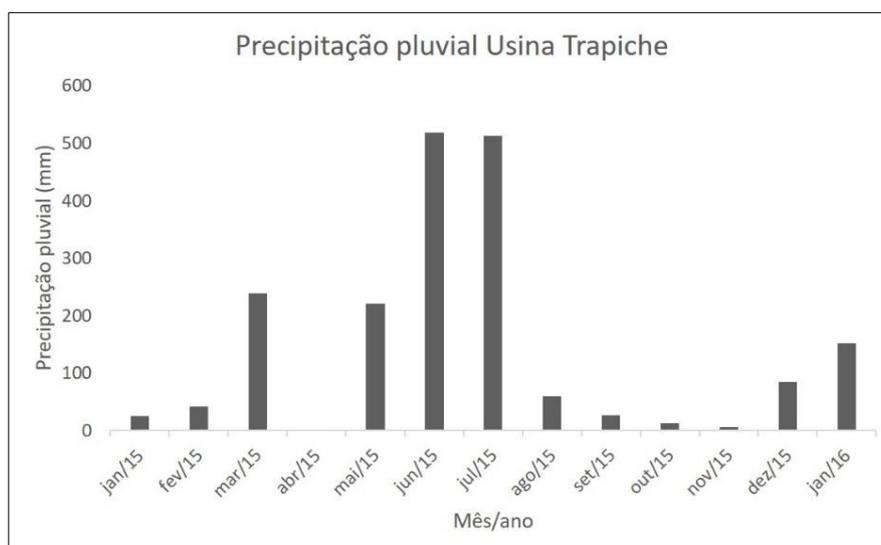
3.3.2 Usina Trapiche, Sirinhaém-Pernambuco

A Usina Trapiche está localizada na Zona da Mata Meridional de Pernambuco, no Município de Sirinhaém, a 75 km do Recife. Esta unidade canavieira foi fundada em 1887 no antigo Engenho Trapiche. A coleta foi realizada em duas áreas pertencentes ao Engenho Rosário, com relevo predominantemente forte-ondulado tendo o plantio da cana-de-açúcar nestes locais iniciado há mais de 50 anos. As variedades e as plantas de referência amostradas na Usina Trapiche estão demonstradas na tabela 4. O regime hídrico é de sequeiro sendo a precipitação pluvial média em mm da safra está apresentada na figura 3. A produtividade agrícola média nas áreas coletadas na safra 2015/2016 foi de 59,3 toneladas de cana por ha (tabela 3).

Tabela 3 - Variedades de cana-de-açúcar no ciclo de primeira soca, plantas referência e produtividade agrícola da Usina Trapiche

	Variedade	Plantas referência	Produtividade agrícola (TCH) ton ha ⁻¹
Área 1	SP81-3250	Gitirana (<i>Ipomea glabra L.</i>)	58,9
	RB867515	Tramoién	65,0
	SP93-3094	Araçá (<i>Psidium cattleianum</i>)	55,8
	SP78-4764	Rabo de raposa (<i>Coniza sumatrensis</i>)	64,9
Área 2	SP81-3250	Melão de S. Caetano (<i>Mormodica charantia</i>)	58,2
	RB867515	Alfazema de caboclo (<i>Hyptis recurvata</i>)	42,9
	SP93-3094	Rabo de raposa (<i>Coniza sumatrensis</i>)	63,4
	SP78-4764	Braquiária (<i>Braquiaria spp</i>) <i>Cyanthillium cinereum</i>	65,0

Figura 3 - Precipitação média durante o período de cultivo em que foram realizadas as coletas em campo na Usina Trapiche. Fonte: APAC



3.3.3 Usina Serra Grande, São José da Laje-Alagoas

A Usina Serra Grande está localizada na região de transição entre a Zona da Mata e o Agreste dos Estados de Pernambuco e Alagoas. É uma usina centenária (uma das mais antigas de Alagoas) situada no município de São José da Laje (a 108 km da capital, Maceió). As variedades de cana e as espécies referência amostradas nesta usina, em áreas com histórico de plantio de mais de 50 anos, estão mostradas na tabela 4.

Tabela 4 - Amostragens de variedades de cana-de-açúcar e plantas referência na Usina Serra Grande, São José da Laje, AL

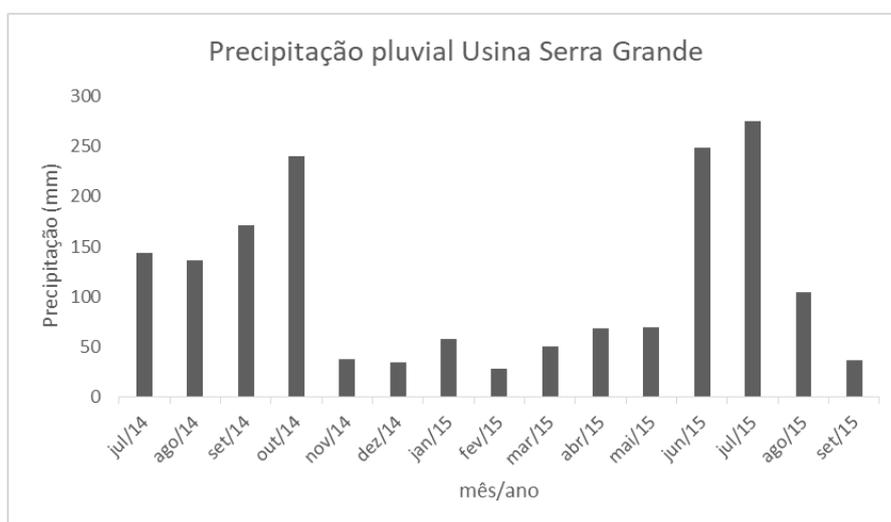
	Variedade	Ciclo	Produtividade agrícola (TCH) ton ha ⁻¹	Plantas referência
Área 1	RB 962962	Planta	29,30	
	RB863129	Planta	62,50	Mentrasto (<i>Ageratum conyzoides</i> L.)
	SP78-4764	Planta	50,11	Mão de sapo (<i>Dactyloctenium aegyptium</i>)
	RB 962962	1ª soca	53,89	Braquiária (<i>Brachiaria spp.</i>)
	RB863129	1ª soca	96,60	
	SP78-4764	1ª soca	68,80	
Área 2	RB 962962	Planta	34,43	Melão de São Caetano (<i>Momordica charantia</i>)
	RB863129	Planta	69,81	
	SP78-4764	Planta	56,60	Caruru (<i>Amarantus viridis</i> L.)
	RB 962962	1ª soca	50,00	Mentrasto (<i>Ageratum conyzoides</i> L.)
	RB863129	1ª soca	87,3	Mela bode (<i>Herissantia tiubae</i>)
	SP78-4764	1ª soca	55,15	Serralha (<i>Sonchus oleraceus</i>)

Antes do plantio foi realizada uma análise de solo para verificar as necessidades de correção de calcário. Para a cana-planta (as deste estudo foram as do plantio de verão, ciclo de 12 meses) foram utilizados 500 kg ha⁻¹ da fórmula 12-20-18. Foi realizada uma adubação fosfatada de fundação (super simples). Para controle de plantas invasoras foi aplicado um herbicida de pré-emergência (de cinco a oito dias após o plantio) sendo a densidade de plantio de 10 gemas por metro linear de cana.

O relevo predominante dessas áreas é suave-ondulado, com regime hídrico de sequeiro (sendo a irrigação utilizada apenas no plantio para garantia de brotação das gemas, com lâmina de 30 mm). A precipitação média na Usina Serra Grande durante o cultivo das variedades coletadas está na figura 4.

Para a cana-soca (as coletadas no presente trabalho foram as do plantio de inverno, 14 meses) após o corte foi realizada uma capina do terreno, seguida da aplicação de herbicida de pré-emergência trinta dias após a brotação das plantas, foi realizada a adubação de cobertura na socaria, utilizando 450 kg ha⁻¹ da fórmula 14-07-21. A produtividade agrícola média na safra 2015/2016 (referente ao período que foi realizada a coleta) está na tabela 7.

Figura 4 - Precipitação média durante o período de cultivo o qual foram realizadas as coletas em campo na Serra Grande. Fonte: Usina Serra Grande



3.3.4 Usina Agrovale, Juazeiro-Bahia

A Agroindústria do Vale do São Francisco (Agrovale) está localizada no município de Juazeiro, ao norte do Estado da Bahia, distante 502 km de Salvador, na região submédica da bacia do rio São Francisco. Foi fundada em 1972, tendo a primeira safra em 1980, sendo a pioneira na produção de álcool e açúcar no Semiárido nordestino. O relevo predominante nas áreas da usina é plano, o regime hídrico desta unidade é irrigado por gravidade no sulco de irrigação. A época de safra inicia-se em meados de abril/maio e termina em novembro. A produtividade média da usina na safra em que foram realizadas as coletas foi de 101,55 t ha⁻¹. Na tabela 5, estão listadas as variedades de cana e as plantas de referência coletadas no plantio comercial da referida unidade.

Tabela 5 - Amostras de variedades de cana-de-açúcar e plantas referência na Usina Agrovale, Juazeiro-Bahia

Variedade	Ciclo	Plantas referência
VAT90-212	Planta	
VAT90-212	1ª soca	
RB92-579	2ª soca	<i>Chloris barbata</i>
RB86-7515	2ª soca	Mão de sapo (<i>Dactilotenium. aegyptium</i>) (L.) Pers.
RB96-1003	Planta	Azeitona (<i>Syzygium cumini</i>)
RB96-1003	1ª soca	
RB96-1003 (vinhaça)	1ª soca	
Clone RBUFAL-1	Planta	
Clone RBUFAL-1	1ª soca	

Na tabela 6 estão demonstradas resumidamente informações sobre as datas dos plantios, fonte de adubação nitrogenada e datas das coletas.

Tabela 6 - Resumo Informações dos plantios comerciais das áreas de estudo

Unidade	Classe de solo	Variedade	Ciclo	Data do Plantio /último corte	Adubação nitrogenada (kg N ha ⁻¹)	Fonte de N utilizada	Data da última adubação antes da coleta	Data da coleta
EECAC	Argissolo amarelo	RB86-3129	1ª soca	Dezembro 2013	70 kg ha ⁻¹	Ureia	Dezembro/2014	10/12/2014
		RB86-7515						
		RB92-579						
Trapiche	Argissolo e Latossolo	RB96-2962	1ª soca	Fevereiro 2015	80 kg ha ⁻¹	Sulfato de amônio	Março/2015	19/11/2015
		RB93-1011						
		SP81-3250						
Serra Grande	Argissolo e Latossolo	RB86-7515	Planta	Dezembro 2014	60 kg ha ⁻¹	Sulfato de amônio	Dezembro/2014	02/09/2015 e 03/09/2015
		SP93-3094						
		SP78-4764						
Serra Grande	Argissolo e Latossolo	RB 96-2962	1ª soca	Dezembro 2014	63 kg ha ⁻¹	Sulfato de amônio	Agosto/2014	02/09/2015 e 03/09/2015
		RB86-3129	1ª soca					
		SP78-4764	1ª soca					
Agrovale	Vertissolo	VAT 90-212	Planta	Julho 2014	143 kg ha ⁻¹	Nitrato de amônio	Não fornecido	25/04/2016
		VAT 90-212	1ª soca					
		RB92-579	2ª soca					
		RB86-7515	2ª soca					
		RB96-1003	Planta					
RB96-1003	1ª soca	1ª soca + vinhaça						
RB96-1003	1ª soca + vinhaça							
RB01-2046	Planta							
Agrovale	Vertissolo	RB01-2046	1ª soca	Julho 2014	143 kg ha ⁻¹	Nitrato de amônio	Agosto/2014	25/04/2016

3.4 Preparação e determinações nas amostras vegetais

Após a coleta no campo, as amostras de material vegetal foram secas em estufa de circulação forçada a 65°C até obtenção de peso constante, moídas em moinho do tipo Willey e foram retiradas subamostras para a realização das análises isotópicas. As alíquotas foram colocadas em recipientes e analisadas no espectrômetro de massas Thermo Quest Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, USA) de interface com um analisador elementar (CarloErba modelo 1110, Milão, Itália). Estas análises foram realizadas no Laboratório de Ecologia de Isótopos do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA-USP) para a obtenção dos teores de nitrogênio-total e carbono-total. A abundância natural do ^{15}N e ^{13}C foram expressas utilizando a notação delta (‰):

$$\delta = (R_{\text{amostra}}/R_{\text{padrão}} - 1) \times 1000$$

Em que R_{amostra} e $R_{\text{padrão}}$ são as razões $^{15}\text{N}:^{14}\text{N}$ e de $^{12}\text{C}:^{13}\text{C}$ da amostra e do padrão (N_2 atmosférico, para o N, e PeeDeeBelenmite para o C), respectivamente.

3.5 Amostragem de solo

Em todos os locais estudados foram realizadas amostragens de solo, nas mesmas áreas e época de amostragem das plantas de cana-de-açúcar e espontâneas (referência), nos intervalos de 0,0-0,2, 0,2-0,4 e 0,4-0,6 m de profundidade. As amostras de solo foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneira de 2,00 mm (10 mesh da ABNT) para a obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA). Essas amostras foram utilizadas em um experimento em casa-de-vegetação para estimar o sinal de ^{15}N do N do solo disponível para as plantas. Subamostras foram coletadas para realização das análises químicas e granulométrica, de acordo com o método da Embrapa (2009). As análises químicas foram realizadas no laboratório de Fertilidade do Solo do IPA (unidade sede-Recife) e as granulométricas no laboratório de Física do Solo do Departamento de Agronomia da UFRPE (Recife). Os resultados destas análises estão demonstrados na tabela 7.

Tabela 7 - Análises químicas e físicas dos solos em profundidade das áreas dos plantios comerciais de cana-de-açúcar em quatro unidades canavieiras nos municípios de Carpina-PE, Sirinhaém-PE, São José da Laje-AL e Juazeiro-BA

Unidade	Prof. (cm)	P (mg dm ³)	pH (H ₂ O)	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	CTC (T)	V	m	Argila	Areia	Silte	Classe Textural
				-----cmol _c dm ⁻³ -----							-----%-----	-----%-----					
EECAC	0-20	21,7	5,2	0,55	0,67	0,04	0,07	0,73	5,59	1,3	7,63	17	36,0	18,93	69,97	11,09	Franco
	20-40	26,7	5,4	0,75	0,67	0,08	0,06	0	5,42	3,6	7,23	22	19	12,05	81,01	6,93	Arenosa
	40-60	11,7	5,3	0,63	0,62	0,06	0,04	1	5,96	1,4	8,03	17	35,0	18,76	72,11	9,13	
Trapiche	0-20	20,3	6,0	3,2	1,2	0,1	0,3	0,04	4,1	4,7	8,9	55,0	0,8	40,3	52,7	6,9	
	20-40	9,7	5,9	1,6	0,8	0,0	0,2	0,2	4,1	2,7	6,9	40,0	5,8	41,3	47,8	10,9	Argilo
	40-60	3,5	6,0	1,1	0,7	0,0	0,1	0,0	2,1	3,6	5,8	59,8	0,0	45,0	44,4	10,6	Arenosa
Serra Grande	0-20	11,5	6,1	2,8	1,2	0,2	0,1	0,0	2,5	3,9	6,3	59,5	0,0	21,8	62,1	16,1	Franco
	20-40	4,8	6,1	2,2	1,3	0,1	0,1	0,0	2,6	3,6	6,2	56,8	0,0	20,9	63,0	16,2	Argilo
	40-60	3,2	5,6	2,0	1,2	0,1	0,0	0,3	3,2	5,1	8,3	61,8	1,8	47,5	44,4	8,1	Arenosa
Agrovale	0-20	43,7	8,1	38,8	1,98	1,27	0,97	0	0,08	43,03	43,06	99,94	0	19,98	22,38	57,65	Franco
	20-40	28,0	7,9	38,2	2,38	1,13	0,9	0	-	42,61	42,61	100	0	7,15	26,42	66,43	Siltosa

3.6 Estimativa da FBN

A principal restrição ao uso da metodologia da abundância natural de ^{15}N para estimativa da FBN em cana-de-açúcar é a dificuldade para encontrar uma planta referência apropriada (no caso deste estudo uma planta que tenha as mesmas características da cana-de-açúcar, mas que não seja fixadora). Esta planta é utilizada para estimar o valor do $\delta^{15}\text{N}$ do N do solo disponível para a cana-de-açúcar. Foram adotadas duas diferentes estratégias para estimar o sinal isotópico do N do solo disponível para essa cultura, nas diversas situações estudadas.

A primeira estratégia foi a identificação e coleta, por ocasião da amostragem das folhas de cana-de-açúcar, de diferentes espécies não leguminosas que ocorram espontaneamente dentro ou nas proximidades das parcelas amostrais, como mencionado anteriormente. Para cada espécie espontânea, amostras compostas de toda a parte aérea foram coletadas. Essas amostras foram processadas e analisadas da mesma maneira descrita para as amostras de cana-de-açúcar. A estimativa do %Ndda foi feita utilizando as abundâncias isotópicas das diferentes espécies espontâneas coletadas nos canaviais. A cana foi identificada como fixadora quando apresentou-se significativamente empobrecida em ^{15}N em relação às médias das referências (HÖGBERG 1997). Quando esta condição foi observada, a FBN foi estimada usando a fórmula recomendada por Shearer & Kohl (1986):

$$\%Ndda = [(\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - \delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}) / \delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})} - B] \times 100$$

Em que: $\delta^{15}\text{N}_{(\text{referência})}$ é o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ do N do solo disponível para a cana-de-açúcar (estimado de duas diferentes formas, descritas a seguir), $\delta^{15}\text{N}_{(\text{fixadora})}$ é o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de cada amostra de cana-de-açúcar para cada parcela e B é o valor de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N. Foi considerado B = 0% (MORAIS et al., 2012).

Uma segunda estratégia foi a investigação da variação, de acordo com a profundidade do sinal de $\delta^{15}\text{N}$ do N do solo disponível para a cana-de-açúcar, adotando o procedimento descrito por Ledgard et al (1984). Para seguir este procedimento, foi realizado um experimento, descrito no item 3.6. O %Ndda da cana-de-açúcar foi

calculado, então utilizando esses valores estimados, correspondendo aos $\delta^{15}\text{N}$ das plantas não fixadoras utilizadas como referência na equação de Shearer & Kohl (1986).

3.7 Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível para as plantas de acordo com a profundidade do solo

Foi realizado um experimento em casa-de-vegetação do Departamento de Energia Nuclear da UFPE, utilizando 132 vasos contendo amostras de 0,5 kg de solo (Figura 5), coletadas nas profundidades de 0,0-0,2, 0,2-0,4 e 0,4-0,6 m, nos quatro locais dos cultivos comerciais de cana-de-açúcar, descritos anteriormente. Nestes vasos, foram cultivadas quatro espécies de plantas não fixadoras, como sugerido por Urquiaga et al. (2012). As plantas utilizadas como referências foram: algodão (*Gossypium hirsutum* L.), girassol (*Helianthus annuus* L.), mamona (*Ricinus communis* L.) e capim buffel (*Cenchrus ciliaris* L.). O ensaio foi montado em um fatorial 4 x 3 x 4 (quatro espécies, três profundidades e quatro locais de coleta de solo), com delineamento em blocos casualizados e três repetições. Cada vaso foi semeado com 8 sementes, deixando-se duas plantas por vaso após desbaste. Os vasos foram irrigadas diariamente até atingirem a capacidade de pote. As plantas foram cultivadas até os 86 dias (de maio a novembro de 2016), quando as mostraram sinais severos de deficiência de nutrientes e pareciam ter parado de crescer

Figura 5 - Experimento em casa de vegetação, com vasos cultivados com plantas de referência não fixadoras de N (girassol, algodão, mamona e capim buffel), aos 45 dias após o plantio utilizando como substrato solos de quatro diferentes locais



As partes aéreas dessas plantas foram coletadas, secas em estufa (a 65° por 72 horas) pesadas, moídas e analisadas para N total e abundância natural do ¹⁵N, como descrito anteriormente. Para estimar o sinal isotópico do N disponível para uma planta com sistema radicular explorando a camada de solo de 0,0 a 0,60 m de profundidade, foi calculada a média ponderada do sinal de ¹⁵N das plantas referências, usando a seguinte equação:

$$\delta^{15}\text{N} = \Sigma (\delta^{15}\text{N}_{\text{rnp}} * \text{N}_{\text{Trp}}) / \Sigma(\text{N}_{\text{Trp}})$$

Em que: $\delta^{15}\text{N}_{\text{rnp}}$ e N_{Trp} são a abundância de ¹⁵N e o N total acumulado, respectivamente, nas espécies cultivadas nos vasos com os solos de cada intervalo de profundidade.

3.7 Estimativa da FBN em cana-de-açúcar cultivada sob diferentes níveis de adubação nitrogenada

Foi instalado um experimento em campo utilizando plantas de segunda socaria (terceiro corte), em 27 de novembro de 2015, com área total de 0,39 ha no Campo São Luiz da Usina Agrovale. A colheita foi realizada no dia 14 de setembro de 2016.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em arranjo fatorial (5 x 5), com cinco níveis de adubação nitrogenada e cinco repetições, totalizando 25 parcelas. Os níveis de adubação nitrogenada foram: 143 kg ha⁻¹ (padrão da usina), 100, 150, 200, 250 kg ha⁻¹ de N na forma de nitrato de amônio (27% de N). As parcelas foram compostas de cinco fileiras com 10 metros de comprimento e 1,5 m entre fileiras totalizando 75 m², utilizando-se as três fileiras centrais como área útil correspondendo a 48m². A variedade utilizada foi a VAT 90-212, por ser a mais plantada na unidade canavieira. O plantio foi irrigado por gravidade no sulco.

As plantas foram coletadas de forma semelhante à dos plantios comerciais, cinco amostras compostas de folhas índice (+3) de cinco plantas de cana-de-açúcar por parcela. Após a coleta no campo, as amostras foram secas em estufa de circulação forçada até obtenção de peso constante (65 °C) por 72 horas, moídas em moinho do tipo Willey e enviadas para determinação do N total (%) e da abundância natural do ¹⁵N, por espectrometria de massa no laboratório do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), no Campus Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, em Piracicaba, São Paulo.

Neste ensaio, também foram amostradas plantas referência (não fixadoras de N) crescendo entre as linhas de cana ou em áreas adjacentes aos canaviais, para estimar o sinal de ^{15}N do N do solo disponível para as plantas. Estas plantas foram identificadas ao nível de espécie pelo Herbário do IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco), secas, moídas e enviadas para o CENA para a determinação da abundância natural do ^{15}N da mesma forma que as folhas de cana.

Ao final do período experimental, por ocasião da colheita, foram realizadas as mensurações da produtividade da cana (TCH) e coletados colmos frescos para a determinação das análises tecnológicas de produtividade de açúcar por hectare (TPH) estimada pela fórmula: $\text{TPH} = [(\text{TCH} \times \text{PCC})/100]$ (em ton ha⁻¹) conforme Lima Neto et al. (2013) em que TPH= tonelada de açúcar por hectare; TCH= toneladas de colmos por hectare e PCC= pol corrigida (sacarose aparente).

3.8 Análises estatísticas

Para a estimativa do %N_{da} nos plantios comerciais os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) considerando o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições por cada unidade canvieira (individualmente). Para isso, o $\delta^{15}\text{N}$ médio de cada variedade de cana, em cada local, foi comparado ao $\delta^{15}\text{N}$ médio de todas as plantas de referência. A comparação das médias para o experimento em casa de vegetação foi realizada para cada planta dentro da mesma profundidade em cada local. Para os experimentos em casa de vegetação e em campo foi realizada a análise de variância (ANOVA) considerado o delineamento em blocos casualizados. Em todos os trabalhos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o programa estatístico Sisvar (versão 5.6). Para as variáveis tecnológicas foi realizado o teste F ao nível de 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Abundância natural do ^{15}N nos plantios comerciais de cana-de-açúcar

4.1.1 EECAC, Carpina – Pernambuco

Os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de referência na EECAC variaram de 3,90‰ a 7,34‰ (tabela 8), considerados valores típicos para plantas não fixadoras de solos da Zona da Mata de Pernambuco (FREITAS et al. 2015). Considerando a média de todas as plantas referências, observa-se que a diferença das médias dos sinais de $\delta^{15}\text{N}$ entre quatro variedades e as plantas testemunha diferiram significativamente teste de Tukey a 5% de probabilidade, o que foi considerado evidência de FBN nestas variedades. A exceção foi a variedade RB92-579, que apresentou maior valor médio do sinal do $\delta^{15}\text{N}$, não diferindo significativamente do valor médio das plantas de referência.

Tabela 8 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) de folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar, plantas não fixadoras de N e estimativas da proporção de N derivado da atmosfera (%Ndda) em cana-de-açúcar cultivada na Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina (EECAC/UFRPE), aos 10 e oito meses após a 1ª rebrota durante o ciclo da cana-soca

	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%Ndda ¹	%Ndda ²	%Ndda ³	%Ndda ⁴
Referências	5,46 A				
<i>Richardia. grandiflora</i>	7,34				
<i>Scolparia dulcis</i>	5,14				
Rabo de raposa	3,90				
Cana-de-açúcar					
RB 92-579 (1ª soca)	4,32 a AB	0	0	0	0
RB 96-2962 (1ª soca)	3,10 b B	57,79	39,70	20,49	43,23
RB 86-7515 (1ª soca)	3,04 b B	58,55	40,79	21,02	44,26
RB86-3129 (1ª soca)	3,03 b B	58,72	41,02	22,24	44,48
RB 93-1011*	2,86 b B	60,97	44,24	26,48	47,51

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as variedades de cana com a média das plantas referência, letras minúsculas comparam as variedades de cana

(*) Cana-soca coletada aos 8 meses de idade

(1), (2), (3) Calculado utilizando *Richardia grandiflora*, *Scolparia dulcis* e rabo de raposa como planta referência, respectivamente

(4) Calculado utilizando a média de todas as plantas referências (5,46 ‰)

Utilizando o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ foliar de todas as plantas referências (5,46 ‰), as variedades de cana consideradas fixadoras apresentaram %N_{dda} bastante próximos entre si, variando entre 43 e 48% (Tabela 8). Esses valores estão aproximados aos encontrados por Boddey et al. (2001) na cana-planta da variedade RB867515 em plantios localizados no estado de São Paulo (variando de 26 a 39% de N_{dda}). Valores médios aproximados de %N_{dda} em diferentes cultivares pelo Brasil mostraram-se diversificados em variedades comerciais cultivadas pelo Brasil, variando de 0 a 76% (ABEYSINGHA; CSWEERARATHNE, 2010; URQUIAGA et al., 2012, 2013; YONEYAMA et al., 1997). Neste caso, das variedades RB 962962 (1ª soca), RB 867515 (1ª soca), RB863129 (1ª soca) e RB 931011 cultivadas em Carpina, pode-se considerar que as estimativas da FBN são bastante confiáveis, pela utilização de diversas plantas referência e pela diferença de mais de 2 ‰ entre os valores isotópicos da cana e das espécies controle. Como foi observada uma certa variação entre as composições isotópicas das plantas referência, foram realizados cálculos utilizando cada espécie controle em separado para estimar o sinal do N do solo disponível para as plantas. Neste caso, o %N_{dda} das canas passa a variar entre 20 e 58 %, Demonstrando a dificuldade de obtenção de uma planta de referência ideal para estimar a FBN em cana-de-açúcar e, por conseguinte, a necessidade de se utilizar mais de uma espécie controle.

A dificuldade para se encontrar uma planta de referência apropriada é a principal restrição da metodologia da abundância natural de ^{15}N para estimar a FBN em cana-de-açúcar pois esta planta é utilizada para fazer a estimativa do sinal isotópico do N do solo que está disponível para as plantas. De acordo com Freitas (2010), é importante que seja selecionada uma planta controle que explore um volume de solo e absorva nutrientes num padrão de tempo semelhante ao da planta alvo (espécie fixadora). Isto é: que as plantas controle e alvo tenham fenologias e hábitos de crescimento semelhantes.

Essa condição é muito difícil de ser atendida em estudos com cana-de-açúcar devido às características de seu sistema radicular e ao seu ciclo de cultivo. Plantas não leguminosas que possam ocorrer espontaneamente junto aos plantios de cana em geral apresentam características bem diversas às da cana-de-açúcar, o que pode resultar em padrões de absorção de N do solo bastante diferentes também. Os padrões podem diferir temporalmente, em volume de solo explorado e até mesmo com relação à forma de absorção (diferentes formas de N mineral ou até mesmo formas mais simples de N orgânico dissolvido). Desta forma, diferentes plantas referência podem estar absorvendo N de compartimentos diferentes, que podem ter sinais isotópicos diferentes, acarretando

que o sinal do N disponível para plantas referência e cana-de-açúcar podem ter sinais isotópicos diferentes. Devido a este fato, foram realizadas simulações de cálculo da %N_{da} (porcentagem de N derivado da atmosfera), utilizando cada espécie de planta referência separadamente como também com a média de $\delta^{15}\text{N}$ de todas as plantas testemunha. Os valores médios de N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, %C e relação C/N estão na tabela 9.

Tabela 9 - Valores médios de %N, $\delta^{13}\text{C}$, %C e relação C/N em cinco variedades de cana de açúcar aos 10 e oito meses após a 1ª rebrota (1ª soca) e três plantas de referência coletadas na Estação Experimental de cana-de-açúcar do Carpina (EECAC/UFRPE)

	%N	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	%C	C/N
Referências	1,31 A	-28,46 B	41,61 B	34,97 A
<i>Richardia grandiflora</i>	1,55	-28,21	39,30	27,15
<i>Scolparia dulcis</i>	1,22	-28,77	43,70	36,99
Rabo de raposa (<i>Conyza sumatrensis</i>)	1,17	-28,41	41,84	40,78
Cana-de-açúcar				
RB 92-579	1,16 a A	-12,47 ab A	44,46 a A	38,53 abA
RB 93-1011 ^(*)	1,11 ab A	-12,80 b A	44,70 a A	40,68 abA
RB 96-2962	1,17 a A	-12,54 ab A	44,85 a A	38,40 b A
RB86-3129	1,07 ab A	-12,79 b A	44,87 a A	42,15 abA
RB 86-7515	0,95 b A	-12,32 a A	42,67 a AB	45,15 aA

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as variedades de cana com a média das plantas referência, letras minúsculas comparam as variedades de cana

⁽¹⁾ N-total (N%), C-total (%C) e relação C/N calculado utilizando as médias das plantas referências *Richardia grandiflora* 1,55%, -28,21‰, 39,30% e 27,15; *Scolparia dulcis*: 1,22%, -28,77‰, 43,70% e 36,99 e rabo de raposa (*Conyza sumatrensis*): 1,17%, -28,41‰, 41,84% e 40,78 como planta referência, respectivamente

^(*) Cana-de-açúcar coletada aos oito meses de idade

A porcentagem de N-total variou de 0,95% a 1,17%, apresentando diferença significativa entre as variedades, mas não apresentando diferença estatística com o N-total das plantas referências. Em relação aos valores de $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ para as variedades de cana estão dentro do esperado para gramíneas com sistema fotossintético C₄. De acordo com Alves et al. (2005), essas plantas apresentam valores que variam de -9 ‰ a -17 ‰. Enquanto as variedades de cana apresentaram valores médios de $\delta^{13}\text{C}$ entre -12,80‰ e -12,32‰, as plantas referência, dicotiledôneas de sistema fotossintético C₃, apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}$ menores que -28 ‰. Os valores médios de %C nas variedades apresentaram -se entre 42,7% a 44,8%, não apresentando diferença estatística significativa nem entre as variedades e entre as canas com as plantas referência apenas a variedade RB86-7515 não apresentou diferença estatística significativa. A relação C/N média para as variedades foram maiores do que 30, apresentando diferença significativa entre si e não diferindo estatisticamente com a relação C/N das plantas utilizadas como

referências. Um destaque para a variedade RB86-7515, que apresentou a maior relação C/N média neste local, que foi de 45,15, embora diferindo apenas da variedade RB962962.

4.1.2 Usina Trapiche, Sirinhaém-Pernambuco

Os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$, N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N das variedades e das plantas referência estão demonstrados na tabela 10. Em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas variedades coletadas na Usina Trapiche das quatro coletadas em ambas áreas, duas delas em cada área apresentaram diferença significativa entre si, porém todas elas não apresentaram diferença estatística significativa entre as variedades e as plantas referências ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Foi observado que os valores médios do N-total (%N) nas canas variaram entre 0,97 e 1,08% (área 1) e não apresentaram diferença significativa entre si. Porém, apresentaram diferença entre as variedades e as plantas referência. Na área 2, os valores médios da %N nas variedades nas quatro variedades coletadas variaram entre 0,80% e 1,08%, apresentando diferença significativa entre duas variedades e não se diferenciando estatisticamente entre as canas e as plantas referência.

O $\delta^{13}\text{C}$ médios das variedades de cana-de-açúcar na área 1 mostraram-se mais enriquecidos, variando de -13,34‰ a -12,45‰, com diferença estatística significativa nas variedades de cana entre si e diferindo-se nas canas com a média das plantas referência (-30,34). Na área 2 os sinais de $\delta^{13}\text{C}$ ‰ mostraram-se em torno de 13‰, não apresentando diferença estatística significativa entre as variedades, mas diferiram entre as variedades e as plantas referência (-25,88‰).

Uma observação a ser destacada é que os sinais de $\delta^{15}\text{N}$ tanto das variedades de cana-de-açúcar quanto nas plantas utilizadas como referência foram abaixo de dez unidades de delta $\delta^{15}\text{N}$ (‰), porém não suficientes para ser constatada a FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N , uma vez que o valor médio do $\delta^{15}\text{N}$ (‰) das plantas de referência foram muito próximos ao da cana-de-açúcar (inferiores a 2‰) não diferindo-se estatisticamente das plantas de referência, o que pode ser mais um indicativo de que pela metodologia da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) para as situações estudadas na Usina Trapiche não foi apropriada para quantificar a FBN. As plantas utilizadas como referência na Usina Trapiche têm portes e ciclos de vida diferentes da cana-de-açúcar além da extensão radicular que as mesmas exploram são bem inferiores aos da cana-de-açúcar (diferença espacial do solo ocupado pela raiz), o que poderia subestimar a

Tabela 10 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$, N-total (‰N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (‰C) e relação C/N de folhas +3 (folhas verde) em quatro variedades de cana-de-açúcar e plantas não fixadoras de N cultivadas na Usina Trapiche, aos 10 meses após a 1ª rebrota durante o ciclo de cana-soca.

Área 1					
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%N	$\delta^{13}\text{C}$	%C	C/N
Referências	3,96 AB	1,80 A	-30,34 B	41,48 A	24,32 B
<i>Ipomea glabra L.</i>	3,33	2,08	-29,51	44,09	20,18
Tramoién	4,76	2,08	-30,01	43,28	21,37
<i>Psidium cattleianum</i>	3,52	1,28	-31,33	43,27	34,35
Rabo de raposa (<i>Coniza sumatrensis</i>)	4,21	1,78	-30,51	37,44	21,39
Cana-de-açúcar					
SP81-3250	5,21 a A	1,08 a B	-13,34 c A	45,58 aA	42,12 a A
RB86-7515	4,80 a A	1,12 a B	-12,45 a A	45,19 abA	40,67 a A
SP93-3094	4,00 b AB	0,97 a B	-12,89 bA	44,81 bcA	46,02 a A
SP78-4764	3,11 c B	1,08 a B	-12,68 abA	44,39 c A	41,11 a A
Área 2					
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%N	$\delta^{13}\text{C}$	%C	C/N
Referências	3,89 A	1,66 A	-25,88 B	40,07 A	28,31 B
Melão de S. Caetano (<i>Mormodica charantia</i>)	6,06	2,76	-27,85	41,26	16,01
Alfazema de caboclo (<i>Hyptis recurvata</i>)	3,00	1,43	-29,15	43,36	31,75
Rabo de raposa (<i>Coniza sumatrensis</i>)	3,60	1,79	-30,06	40,17	24,30
Braquiária (<i>Braquiaria spp.</i>)	2,75	1,19	-13,49	40,90	34,53
<i>Cyanthillium cinereum</i>	4,07	1,01	-29,62	33,30	36,62
Cana-de-açúcar					
SP81-3250	3,86 ab A	1,08 a A	-13,33 a A	44,42 a A	41,40bAB
RB86-7515	3,59 b A	0,80 b A	-13,15 a A	43,90 a A	56,82 a A
SP93-3094	4,01 ab A	0,99 ab A	-13,39 a A	43,63 a A	44,56ab A
SP78-4764	4,74 a A	1,00 ab A	-13,14 a A	42,74 b A	43,53abAB

Médias seguidas de letra iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as variedades de cana com a média das plantas referência, letras minúsculas comparam as variedades de cana

mensuração da FBN sendo confirmado pelos valores médios de %N_{dda} calculado para cada planta referência e a média de todas as espécies de plantas testemunhas.

Alguns fatores podem influenciar na determinação e ocorrência da FBN em cana-de-açúcar, tais como: variedade de cana-de-açúcar, a interação microrganismo-planta e condições edafoclimáticas. Na Usina Trapiche, após o corte da cana-planta e a época de rebrota da cana-soca (em fevereiro de 2015) ocorreu uma baixa precipitação no local (figura 3) e de acordo com Boddey et al. (2003) alguns fatores como disponibilidade de água, são fundamentais para qualquer processo biológico e deve ser colocado em primeiro plano e a umidade do solo para a fixação biológica de N_2 é apontada como primordial. Urquiaga (2017) ressalta que em períodos secos ocorre menor colonização de algumas estirpes de bactérias, sendo que a baixa umidade do solo afeta a fotossíntese e o crescimento da planta.

Biggs et al. (2002) e Hoefsloot et al. (2005) em estudos conduzidos na Austrália e África do Sul utilizando a técnica da abundância natural de ^{15}N , indicaram que a FBN não foi uma fonte significativa de N para a cultura pois em ambos locais o $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ das plantas utilizadas como referência apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ iguais ou menores que o da cana-de-açúcar. Em contrapartida, Urquiaga et al. (2012) estudando FBN em variedades comerciais e híbridas observaram que os valores de ^{15}N das amostras de folha de cana-de-açúcar foram menores do que o das plantas de referências, e que houve uma contribuição de N derivado da FBN variando de 29 a 68% nas variedades comerciais.

Quanto ao fator variedade, Coelho et al. (2003) realizaram um estudo utilizando a técnica da abundância natural do ^{15}N para identificar de nove genótipos de cana-de-açúcar (sete comerciais e dois silvestres) quais teriam potencial de receber contribuição da FBN com avaliação aos seis e 18 meses de idade e concluíram que ocorreu a FBN em quatro dessas variedades e o processo de FBN contribuiu de forma significativa para a nutrição nitrogenada de quatro variedades comerciais, permitindo produtividades elevadas de forma sustentável, mesmo quando a lavoura é cultivada em solos de baixa disponibilidade de N para as plantas.

O carbono total (%C) na área 1 apresentou valores médios entre 44,39% e 45,58% entre as variedades, diferindo estatisticamente entre as mesmas mas não apresentando diferença entre as variedades e a média das plantas de referência (41,48%). Fato semelhante ao da área 2, que apresentou valores médios entre 44,39% e 45,58% entre as variedades, sem diferença estatística significativa. Na área 2, os valores médios foram semelhantes a os da área 1 (entre 42,74% e 44,42%) e comparando as médias das variedades entre si, em apenas 1 variedade foi constatada a diferença estatística significativa (SP78-4764) com a menor porcentagem de %C (42,74%).

A relação C/N em ambas as áreas apresentaram-se acima de 40, mostrando que ocorreu maior imobilização de N no solo, reduzindo também os teores deste nutriente na cana-de-açúcar. Na área 1, as variedades não diferiram significativamente entre si, mas ocorreu diferença significativa entre as variedades de cana-de-açúcar e as plantas de referência (24,32). Na comparação das quatro variedades de cana entre si não ocorreu diferença estatística significativa em duas delas (a SP-3094 e a SP78-4764) e comparando entre as médias das canas e as médias das plantas utilizadas como referências as variedades SP81-3250 e a SP78-4764 não apresentaram diferença estatística significativa. Ramos et al. (2016) estudando decomposição da palhada da cana-de-açúcar recolhida em diferentes níveis observaram que os maiores valores de relação C/N nos tratamentos com

as menores quantidades de palha, na 3ª soca confirmam que a decomposição foi de fato menos intensa nesses tratamentos.

4.1.3 Usina Serra Grande, São José da Laje - Alagoas

Os valores médios do $\delta^{15}\text{N}$ diferiram entre si (tabela 11). Porém, se comparadas em relação à média de todas as plantas utilizadas como referência apenas as variedades no ciclo de cana-soca mostraram-se potenciais para a fixação biológica de nitrogênio (as variedades diferiram das plantas utilizadas como referência).

Tabela 11 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ em folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar e plantas de referência cultivadas na Usina Serra Grande (São José da Laje, Alagoas) nos ciclos de cana-planta e cana-soca aos 10 e 14 meses após o plantio e 1ª rebrota, respectivamente

Área 1					
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%Ndda ¹	%Ndda ²	%Ndda ³	%Ndda ⁴
Referências	9,84 A				
<i>Dactyloctenium aegyptium</i>	11,82				
<i>Brachiaria spp.</i>	7,87				
Cana-de-açúcar					
RB 962962 (Planta)	8,43 a AB	40,88	11,23	29,03	
RB863129 (Planta)	7,48 ab ABC	49,80	24,60	39,70	
SP78-4764 (Planta)	6,99 bc BC	36,70	4,92	24,00	
RB 962962 (1ª soca)	5,94 cd BC	52,22	28,26	42,64	
RB863129 (1ª soca)	5,64 d C	28,68	0	14,38	
SP78-4764 (1ª soca)	5,43 d C	54,03	30,98	44,81	
Área 2					
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$				
Referências	8,27 A				
<i>Momordica charantia</i>	9,43				
<i>Herissantia tiubae</i>	8,49				
<i>Sonchus oleraceus</i>	6,90				
Cana-de-açúcar					
RB 962962 (Planta)	9,21 b A	10,09	0,16	0	0
RB863129 (Planta)	8,48 ab A	23,67	15,25	0	13,02
SP78-4764 (Planta)	7,19 b AB	2,27	0	0	0
RB 962962 (1ª soca)	5,61 c B	41,96	35,55	20,71	22,86
RB863129 (1ª soca)	5,55 c B	41,13	34,63	19,6	32,91
SP78-4764 (1ª soca)	5,47 b B	40,41	33,82	18,6	32,09

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as variedades de cana com a média das plantas referência, letras minúsculas comparam as variedades de cana.

Área 1: ⁽¹⁾ e ⁽²⁾ Calculado utilizando *Dactyloctenium aegyptium* e *Brachiaria spp* como plantas de referência, respectivamente

⁽³⁾ Calculado utilizando todas as plantas de referência da área 1

Área 2: ⁽¹⁾, ⁽²⁾ e ⁽³⁾ Calculado utilizando *Momordica charantia*, *Herissantia tiubae* e *Sonchus oleraceus* como plantas de referência, respectivamente

⁽⁴⁾ Calculado utilizando todas as plantas de referência da área 2

Quando consideradas cada espécie de referência individualmente, foram observadas disparidades nas %Ndda mostrando a dificuldade em se adotar apenas uma planta como referência. No ciclo de cana-planta, os valores médios de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ da cana foram muito próximos aos valores médios das plantas utilizadas como referência, não sendo possível a aplicação da técnica de abundância natural.

Na tabela 12 encontram-se também os valores médios de N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N nas variedades de cana e plantas referências na Usina Serra Grande. Na área 1, observa-se que o N-total entre as variedades variou de 1,15 e 1,51% na cana-planta e 1,24% a 1,53% na cana-soca, mostrando com diferença estatística significativa entre si e não se diferenciando estatisticamente da média das plantas

referências. Na área 2, os valores médios de N-total (%N) foram de 0,97% a 1,59% diferindo-se as variedades entre si e quando comparadas com as plantas referência, as mesmas apresentaram diferença estatística das variedades de cana. O carbono total (%C) médio entre as canas foi entre 42,84% e 44,85%, sem diferença estatística entre as variedades e mostrando diferença significativa entre as variedades e plantas de referência apenas entre duas variedades: a RB962962 e a RB863129 sendo que esta última se diferenciou estatisticamente das plantas referências nos dois ciclos coletados.

Tabela 12 - Valores médios de N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N em folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar e plantas de referência cultivadas na Usina Serra Grande (São José da Laje, Alagoas) nos ciclos de cana-planta e cana-soca aos 10 e 14 meses após o plantio e 1ª rebrota, respectivamente

	Área 1			
	%N	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	%C	C/N
Referências	1,7 A	-12,66 C	36,92B	22,56 C
<i>Dactyloctenium aegyptium</i>	1,78	-13,14	33,30	19,31
<i>Brachiaria spp.</i>	1,61	-12,18	40,55	25,81
Cana-de-açúcar				
RB 96-2962 (Planta)	1,51 a AB	-11,43 a A	43,07 a A	28,75 c BC
RB86-3129 (Planta)	1,15 c B	-11,71 abAB	44,85 a A	39,12 a A
SP78-4764 (Planta)	1,42 ab AB	-12,11 c BC	43,04 a A	30,41 bc B
RB 96-2962 (1ª soca)	1,24 bc B	-11,56 abAB	44,09 a A	35,62 ab AB
RB86-3129 (1ª soca)	1,38abc AB	-11,74 b AB	44,93 a A	32,69 bc AB
SP78-4764 (1ª soca)	1,53 a AB	-11,75 b AB	42,84 a AB	28,16 c BC
	Área 2			
	%N	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$	%C	C/N
Referências	3,44 A	-30,72 B	40,49 A	12,51 E
<i>Momordica charantia</i>	4,34	-29,83	41,22	9,52
<i>Herissantia tiubae</i>	3,42	-30,04	43,74	13,57
<i>Sonchus oleraceus</i>	2,56	-32,29	36,52	14,44
Cana-de-açúcar				
RB 96-2962 (Planta)	1,41 ab B	-11,76 a A	41,40 ab A	29,60 bc CD
RB86-3129 (Planta)	1,59 a B	-11,89 a A	42,28 a A	26,55 c D
SP78-4764 (Planta)	0,97 c B	-12,30 a A	43,56 a A	45,14 a A
RB 96-2962 (1ª soca)	1,23 b B	-11,81 a A	42,28 a A	34,94 b BC
RB86-3129 (1ª soca)	1,41 ab B	-11,87 a A	43,69 a A	30,99 bc BCD
SP78-4764 (1ª soca)	1,21 b B	-12,17 a A	43,36 a A	35,43 b B

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as variedades de cana com a média das plantas referência, letras minúsculas comparam as variedades de cana

N-total (N%), $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$, C-total (%C) e relação C/N calculado utilizando as médias das plantas referências *Dactyloctenium aegyptium* 1,78%, -13,14‰, 33,30% e 22,56; *Brachiaria spp.* 1,61%, -12,18‰, 40,55%, 25,81 (Área 1) *Momordica charantia* 4,34%, -29,83‰, 41,22% e 9,52; *Herissantia tiubae* 3,42%, -30,04‰, 43,74% e 13,57; *Sonchus oleraceus* 2,56%, -32,29‰, 36,52% e 14,44 (Área 2) como planta referência, respectivamente.

Em relação aos valores médios da relação C/N na área 1 entre as variedades de cana da Usina Serra Grande variaram entre 28,17 e 39,12 para a cana-planta e 28,16 e 35,62 para a cana-soca, diferindo estatisticamente tanto entre as variedades quanto entre

as canas e as plantas de referência. Os valores médios para a relação C/N na área 2 variaram entre 26,55 e 45,14 na cana-planta e 30,99 a 35,43 na socaria, com diferença estatística significativa tanto entre as variedades de cana quanto na comparação entre as variedades com as plantas de referência nas duas áreas coletadas.

Boddey et. al. (2001), em um levantamento realizado nas principais regiões produtoras do Brasil constataram que a contribuição da FBN no primeiro ciclo de cultivo, quando a cultura geralmente não responde à fertilização nitrogenada, alcançou até 71% das necessidades de N. Constataram também que a FBN em cana é fortemente dependente da variedade, tipo de solo e das condições de umidade do solo e as condições de baixa precipitação.

De acordo com Urquiaga (2017) a colonização da cana por algumas estirpes de bactérias endofíticas varia conforme a disponibilidade de água no solo. Em períodos secos ocorre menor colonização de algumas estirpes de bactérias, sendo que a baixa umidade do solo afeta a fotossíntese e o crescimento da planta.

Em relação à cana-soca a diminuição nos valores de $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ poderia ser um indicativo de que, na medida em que o solo exaure-se pelos cultivos começa a se expressar de forma mais significativa (SCHULTZ et al., 2016).

4.1.4 Usina Agrovale, Juazeiro-Bahia

Na área de plantio comercial da Usina Agrovale (tabela 13) foi observado que a maioria das variedades coletadas apresentaram valores de abundância natural de ^{15}N com diferença estatística significativa entre si, mas não foram diferentes em relação às plantas referências e dessa forma, não atenderam a condição estabelecida para que fosse aplicada a técnica de abundância natural.

A ausência de potencial para a FBN Polidoro (2001) atribuiu a doses elevadas de N em lavouras com alta recuperação do N-fertilizante, que poderiam inviabilizar a aplicação da técnica primeiramente pelo baixo valor do $\delta^{15}\text{N}$ no N-fertilizante ($\sim 0\text{‰}$) que seria uma fonte confundida com o N proveniente da FBN, o que poderia superestimar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio e também por um efeito de inibição sobre o processo de FBN nas bactérias associadas às plantas causadas pelo N-mineral absorvido aplicado ao solo e absorvido pelas plantas.

Os valores de N-total (%), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N nas folhas das variedades coletadas na Agrovale e das plantas utilizadas como referência estão apresentadas na tabela 15. Observa-se que os teores médios de nitrogênio-total variaram entre 0,77% (RB92579, 3ª soca) e 1,05% (VAT90-212, cana-planta) e apresentaram diferença estatística significativa para as variedades entre si, mas não diferindo estatisticamente da média das plantas referências, mostrando que a dose de N aplicada fez que diminuísse a concentração de N nas plantas.

O carbono-total (%C) para as canas da Agrovale variou entre 41% e 43% não diferindo estatisticamente entre a cana-de-açúcar e as plantas de referência. Para a relação C/N foi constatado valores médios acima de 30, caracterizando assim a alta relação C/N neste grupo de plantas (tabela 13).

Tabela 13- Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰), N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, C-total (%C) e relação C/N em folhas +3 (folhas verde) de cana-de-açúcar e plantas de referência cultivadas na Usina Agrovale (Juazeiro, Bahia) nos ciclos de cana-planta e cana-soca aos 10 meses após o plantio e 2ª rebrota, respectivamente

	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%N	$\delta^{13}\text{C}$	%C	C/N
Referências	10,08 BC	0,96 AB	-17,10 A	39,90 A	48,14 A
<i>Chloris barbata</i>	8,16	0,53	-12,24	42,60	80,33
<i>Diplachne fusca var. fasciculatus</i>	16,30	1,19	-13,24	33,69	28,43
<i>Syzygium jambolanum DC.</i>	6,19	0,87	-28,96	43,73	50,31
Cana-de-açúcar					
VAT90-212 (Planta)	17,30 a A	1,05 ab AB	-13,74 d A	43,50 a A	41,50 bc A
VAT90-212 (1ª soca)	14,65 b AB	0,88 cd AB	-13,36 c A	42,99 ab A	49,06 abc A
RB92-579 (2ª soca)	12,52 c ABC	0,77 d B	-12,98 ab A	42,84 ab A	55,89 a A
RB86-7515 (2ª soca)	11,53 cd BC	0,87 cd AB	-12,93 ab A	43,07 a A	50,07 abc A
RB96-1003 Planta	10,57 cd BC	1,20 a A	-13,21 bc A	41,52 ab A	34,58 c A
RB96-1003 (1ª soca)	10,06 de BC	0,89bcd AB	-12,66 a A	41,09 b A	46,37 bc A
RB96-1003					
(1ª soca + vinhaça)	9,84 def BC	0,86 cd AB	-13,15 bc A	42,25 ab A	49,14 abc A
RB01-2046 (Planta)	8,24 f C	0,99 bc AB	-13,12 bc A	42,49 ab A	42,91 bc A
RB01-2046 (1ª soca)	7,92 f C	0,81 d AB	-13,04 bc A	42,91 ab A	53,10 ab A

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.2 Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível para as plantas de acordo com a profundidade do solo

De forma geral, observa-se que os valores da abundância de $\delta^{15}\text{N}$ de todas as espécies de plantas (não fixadoras) de referência foram menores nas camadas superficiais (tabela 14), indicando enriquecimento da abundância natural de ^{15}N em profundidade.

Nos solos de todas as áreas (exceto da Usina Trapiche), neste os valores de ^{15}N não diferiram significativamente entre as espécies, em cada profundidade.

De acordo com Landell et al. (2005), boa parte da biomassa de raízes da cana-de-açúcar ocorre até os 40 cm. Diante desse fato, existe uma possibilidade de que as plantas de referência coletadas no campo e a cana-de-açúcar estariam explorando volumes de solo distintos e que poderia haver subestimação das estimativas de fixação biológica de N_2 apresentadas anteriormente, pois foram observadas diferenças nos valores médios do $\delta^{15}\text{N}$ entre as plantas referência coletadas no campo e as cultivadas em casa de vegetação. Conseqüentemente, os valores de %Ndda mais apropriados para cada uma das espécies nos quatro locais de estudo estão apresentados na tabela 14. Para os cálculos destas %Ndda foram utilizados os valores médios ponderados de $\delta^{15}\text{N}$ para as plantas de referência cultivadas em casa de vegetação encontrados para as profundidades de 0-60cm (para a EECAC, usina Trapiche e usina Serra Grande) e 0-40cm (usina Agrovale).

Tabela 14 - Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível em profundidade em plantas referência cultivadas em vaso em solo proveniente em locais de coleta

		Planta referência				
		Girassol	Mamona	Algodão	Capim buffel	
Local	Profundidade (cm)	----- $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ -----				
Carpina	0-20	6,90 a	7,22 a	4,46 a	4,87 a	
	20-40	7,13 a	7,69 a	6,25 a	5,73 a	
	40-60	7,54 a	8,38 a	7,24 a	6,56 a	
Média ponderada*		7,14	7,85	5,83	5,61	6,61**
Trapiche	0-20	6,57 a	7,84 a	4,59 a	5,22 a	
	20-40	7,70 a	6,45 ab	6,47 ab	5,46 b	
	40-60	6,95 ab	7,44 a	5,57 b	5,38 b	
Média ponderada*		7,11	7,24	5,58	5,36	6,32**
Serra Grande	0-20	6,33 a	7,14 a	5,41 a	5,20 a	
	20-40	8,81 a	7,08 a	6,41 a	8,91 a	
	40-60	8,33 a	7,20 a	5,98 a	8,71 a	
Média ponderada*		7,80	7,14	5,82	7,56	7,08**
Agrovale	0-20	6,07 a	5,76 a	5,09 a	3,92 a	
	20-40	6,43 a	6,16 a	4,23 a	4,20 a	
Média ponderada*		6,20	5,95	4,74	4,03	5,23**

Valores de médias seguidos de letras minúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Média ponderada do $\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ para as plantas de referência de acordo com equação de Urquiaga et al. (2012)

** Média dos valores ponderados para cada local

Com base nestes dados, os valores da FBN na EECAC variaram entre 34,6% na variedade RB92579, a 56,7% nas variedades RB863129 e RB931011, mostrando uma diferença média de 11%. Na Usina Trapiche, na área 1 o %Ndda foi de 17,6%, na RB867515 a 50,8% na SP93-3094 um aumento médio de 11% em relação à estimativa realizada com todas as plantas de referência coletadas no campo. Na área 2, as contribuições de FBN foram de 25,03% (SP93-3094) a 43,22% (RB784764), resultando numa diferença média de 32,31% em relação à primeira estimativa, com as plantas referência coletadas no campo (tabela 15).

Tabela 15 - Estimativas da proporção de N derivado da atmosfera (%Ndda) estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N utilizando como valor de $\delta^{15}\text{N}$ da planta referência o valor da média ponderada para as profundidades de 0-0,6 m (em cana-de-açúcar cultivada na EECAC, Usina Trapiche e Usina Serra Grande) e nas profundidades de 0-0,4 m (para a cana-de-açúcar cultivada na Usina Agrovale).

EECAC		
Referências*	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%Ndda
	6,61	
Cana-de-açúcar		
RB863129 (1ª soca)	3,03	56,7
RB 867515 (1ª soca)	3,04	54,0
RB 92579 (1ª soca)	4,32	34,6
RB 96-2962 (1ª soca)	3,10	53,1
RB 931011 (1ª soca 8 meses)	2,86	56,7
Usina Trapiche Área 1		
Referências*	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%Ndda
	6,32	-
Cana-de-açúcar		
SP81-3250 (1ª soca)	5,21	17,6
RB86-7515 (1ª soca)	4,80	24,1
SP93-3094 (1ª soca)	4,00	36,7
SP78-4764 (1ª soca)	3,11	50,8
Usina Trapiche Área 2		
Referências*	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%Ndda
	6,32	-
Cana-de-açúcar		
SP81-3250 (1ª soca)	3,86	39,8
RB86-7515 (1ª soca)	3,59	43,2
SP93-3094 (1ª soca)	4,01	36,6
SP78-4764 (1ª soca)	4,74	25,0
Usina Serra Grande Área 1		
Referências*	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%Ndda
	7,08	-
Cana-de-açúcar		
RB 962962 (Planta)	8,43	0
RB863129 (Planta)	7,48	0
SP78-4764 (Planta)	6,99	1,3
RB 962962 (1ª soca)	5,94	16,1
RB863129 (1ª soca)	5,64	20,3
SP78-4764 (1ª soca)	5,43	23,3

Continua...

...Continuação

Usina Serra Grande Área 2		
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%Ndda
Referências*	7,08	-
Cana-de-açúcar		
RB 962962 (Planta)	9,21	0
RB863129 (Planta)	8,48	0
SP78-4764 (Planta)	7,19	0
RB 962962(1ª soca)	5,61	20,8
RB863129 (1ª soca)	5,55	21,6
SP78-4764 (1ª soca)	5,47	22,7
Usina Agrovale		
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	%Ndda
Referências*	5,23	
RB 961003 (planta)	17,30	0
RB 961003 (1ª soca)	12,52	0
RB 961003 (1ª soca + vinhaça)	11,53	0
VAT 90-212 (planta)	14,65	0
VAT 90-212 (1ª soca)	10,57	0
RB 012046 (planta)	9,84	0
RB 012046 (1ª soca)	10,06	0
RB 92579 (2ª soca)	8,24	0
RB867515 (2ª soca)	7,92	0

*Valor da média ponderada das plantas de referência girassol, mamona, algodão e capim buffel cultivadas em casa de vegetação com os solos dos diferentes locais nas profundidades de 0-60 cm.

Na Usina Serra Grande, com a redução dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas referências para as profundidades de 0-60 cm (resultante da média ponderada do $\delta^{15}\text{N}$ das plantas referência para as profundidades de 0-60 cm) as porcentagens de N derivado da atmosfera estimadas pela técnica de abundância natural do $\delta^{15}\text{N}$ foram relativamente baixas em algumas variedades (abaixo de 25%) e para as demais o $\delta^{15}\text{N}$ das canas e das referências foram muito aproximados, resultando em nenhuma entrada de N proveniente da FBN.

Situação semelhante aconteceu na Usina Agrovale, onde observa-se uma redução em mais de 50% no valor do $\delta^{15}\text{N}$ comparando com o das plantas referências coletadas no campo (tabela 15). Dessa forma, foi constatado que não ocorreram entradas de N estimado pela técnica de abundância natural (ou ocorreram em quantidades relativamente pequenas) para nenhuma das variedades independente do ciclo da cultura, confirmando então os resultados obtidos em comparação estatisticamente significativa com as plantas de referência coletadas no campo.

Estes resultados corroboram os resultados de Xavier (2006), Schultz (2012), Baptista et al. (2014) e Urquiaga et al. (2012), que verificaram aumento nos valores de abundância de $\delta^{15}\text{N}$ conforme a profundidade aumentava. Vale destacar que no presente estudo em casa de vegetação não foram utilizados adubos nos solos como realizado nos trabalhos anteriormente citados.

De acordo com Xavier (2006), a explicação os menores sinais isotópicos nas camadas superficiais pode ser atribuídos à morte das raízes que ocorre de um ciclo para o outro e ao fato de que as raízes das soqueiras tenderem a ser mais superficiais. A decomposição das raízes pode favorecer a entrada de N proveniente da FBN nas camadas superficiais do solo. Schultz et al. (2012) verificaram que este acréscimo nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ em profundidade pode resultar no aumento nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas folhas bandeira da cana-de-açúcar, se os benefícios proporcionados pelo inoculante à cana estiverem associados ao aumento do sistema radicular da cultura.

4.3 Abundância natural de ^{15}N , produtividade e variáveis tecnológicas em cana-de-açúcar cultivada sob diferentes níveis de adubação nitrogenada no semiárido

As doses crescentes de nitrato de amônio não resultaram em diferença significativa nos valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ da cana e das plantas de referência indicando a ausência da FBN. Como todos os tratamentos receberam pelo menos 100 kg ha^{-1} de N, a população de bactérias diazotróficas pode ter sido reduzida (tabela 15).

Polidoro (2001) em levantamento em várias regiões canavieiras do Brasil concluiu que doses elevadas de N-fertilizante fazem com que haja diminuição na população de bactérias Perin et al (2004) estudaram a diversidade da população de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cultivares de cana-de-açúcar cultivadas na Bahia que receberam 82 kg ha⁻¹ no plantio e 202 kg ha⁻¹ e verificaram que a aplicação de doses altas de N diminuiu a diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Schultz (2012) considerou a possibilidade de que a FBN funciona de forma complementar à disponibilidade de N do solo.

Em relação à média de N-total (%N), $\delta^{13}\text{C}$, e relação C/N os valores de N-total ficaram de 0,88% a 0,93% sem diferenças significativas.

Tabela 15 - Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ (‰), %N, $\delta^{13}\text{C}$, %C e relação C/N em folhas +3 (folhas verde) na cana-soca da variedade VAT 90-212 e em plantas de referência cultivadas na dose padrão (143 kg ha⁻¹) e em doses crescentes de N aos 7 meses após a 2^a rebrota na Usina Agrovale (Juazeiro, Bahia).

	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%N	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	%C	C/N
Referências	9,26 A	1,66 A	-20,44 A	36,87 B	24,90 B
<i>Dactilotenium. aegyptium</i> (L.) Pers.		1,66			
Tratamentos					
T1 – 143 kg ha ⁻¹ de N (27% de N)	8,94 a A	0,88 a B	-13,07 a A	43,44 a A	49,03 a A
T2 – 100 kg ha ⁻¹ de N (27% de N)	10,21 aA	0,91 a B	-13,15 a A	42,62 abA	46,03 a A
T3 – 150 kg ha ⁻¹ de N (27% de N)	9,38 a A	0,92 aB	-13,06 a A	42,57 abA	46,38 a A
T4 - 200 kg ha ⁻¹ de N (27% de N)	10,20 aA	0,93 a B	-13,06 a A	42,32 b A	45,69 a A
T5 – 250 kg ha ⁻¹ de N (27% de N)	9,25 a A	0,93 a B	-13,10 a A	42,19 b A	45,30 a A

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam as doses crescentes de N com a média das plantas referência, letras minúsculas comparam as doses crescentes de N entre si.

A relação C/N teve valores altos caracterizada provavelmente pela alta produção de fitomassa, variando de 45,3 (dose de 250 kg ha⁻¹ de N) a 49,03 (143 kg ha⁻¹ de N), diferindo estatisticamente das plantas de referência. Em relação ao enriquecimento de ^{13}C , não houve diferenças significativas nem entre doses ou entre as doses com as plantas de referência. As porcentagens de carbono total da cana variaram de 42,2% a 43,4%, acima da %C das plantas de referência.

A produtividade agrícola e as variáveis tecnológicas da cana-de-açúcar estão na tabela 16. De forma geral, a produtividade agrícola (TCH) e o açúcar total recuperável (ATR) não diferiram com as doses crescentes de N (tabela 17). Já o rendimento industrial (TPH), foi maior com a dose de 150 kg ha⁻¹ de N. apresentou o maior rendimento industrial (TPH) médio.

O rendimento e a produção de açúcar e de álcool da cana-de-açúcar irrigada dependem da quantidade de água aplicada, do manejo de irrigação combinado com a quantidade certa de adubação, da variedade, da idade do corte, do tipo de solo e do clima (DANTAS NETO et al., 2003).

Prado & Pancelli (2006) trabalhando com nutrição nitrogenada e doses crescentes de N na socaria também que não verificaram houve efeito significativo dos tratamentos na qualidade tecnológica dos colmos em relação às doses crescentes de N na primeira soqueira.

Tabela 16 - Produtividade agrícola (TCH) e índices tecnológicos da cana-de-açúcar: produtividade industrial (TPH), sacarose aparente (PCC%) e açúcares totais redutores (ATR) em função das doses de N na variedade VAT 90-212 aos 7 meses após a 2ª rebrota na Usina Agrovale, Juazeiro-BA.

Tratamentos	TCH (t ha ⁻¹)	PCC %	ATR	TPH
T1 – 143 kg ha ⁻¹ de N	152	14,58	145,11	22,17
T2 – 100 kg ha ⁻¹ de N	144	15,05	149,49	21,67
T3 – 150 kg ha ⁻¹ de N	150	14,80	147,22	22,23
T4 - 200 kg ha ⁻¹ de N	158	13,91	138,91	22,03
T5 – 250 kg ha ⁻¹ de N	153	13,28	133,04	20,39
Média	151	14,32	142,75	21,70
Teste F Blocos	1,47 ns	1,82 ns	1,79 ns	
Teste F Tratamentos	0,98 ns	1,76 ns	1,74 ns	

Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Nos plantios comerciais, da EECAC quatro variedades de cana-de-açúcar (RB931011, RB962962, RB863129 e RB867515) estavam recebendo contribuições da FBN mas uma não estava (RB92579).
2. Nos plantios em Trapiche e Agrovale não se observou contribuição da FBN para nenhuma variedade estudada. Em Serra Grande, as variedades SP78-4764 (cana-planta e cana-soca), RB862962 e RB863129 (socaria) estavam recebendo contribuições da FBN.
3. Ocorreu enriquecimento $\delta^{15}\text{N}$ em profundidade em todos os locais estudados, o que causou aumento da abundância de $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas de referência e nas porcentagens de nitrogênio derivado da atmosfera pela cana-de-açúcar nas variedades cultivadas na EECAC e na Usina Trapiche.
4. A variedade VAT90-212 com doses crescentes de nitrato de amônio em condições irrigadas no Vale do São Francisco não se beneficiou com a FBN.
6. O aumento de doses de N nas condições de estudo da Usina Agrovale não influenciou as variáveis envolvidas no estudo de abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$
7. O aumento de doses de N nas condições do estudo na Usina Agrovale não foi significativa para as variáveis TCH, TPH, PCC e ATR

REFERÊNCIAS

- AHMED, Roohi; KHATTAK, Sanam Wagma; SIRAJ, Kubra. IMPACT OF AREA UNDER CULTIVATION, CREDIT DISBURSEMENT AND FERTILIZERS OFF-TAKE ON SUGARCANE PRODUCTION: AN ECONOMETRIC ANALYSIS. **Journal Of Global Innovations In Agricultural And Social Sciences**, v. 2, n. 4, p.185-189, 1 dez. 2014.
- ALVES, B. et al. Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e do nitrogênio no sistema solo-planta. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Eds.). . **Emprego de Isótopos Estáveis para o Estudo do Carbono e do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta**. Brasília, Embrapa-SCT.:. p. 343–368.
- ALVES, G. C. et al. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1–2, p. 307–321, 2015.
- BALDANI, J. I. et al. Fixação Biológica de Nitrogênio em Plantas da Família Poaceae (Antiga Gramineae). **Tópicos em Ciência do Solo - Volume VI**, p. 203–271, 2009.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 33, p. 549–579, 2005.
- BAPTISTA, R. B. et al. Variations in the ^{15}N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N_2 fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 124–129, 2014.
- BASANTA, M. V. et al. Management effects on nitrogen recovery in a sugarcane crop grown in Brazil. **Geoderma**, v. 116, n. 1–2, p. 235–248, 2003.
- BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; IGNOTO, R. D. F. Produção De Amônia Anidra E Aquamônia enriquecida em 15N a partir de $(15\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 595–603, 2002.
- BENEDUZI, A. et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94–104, 2013.
- BIGGS, I. M. et al. N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant and Soil**, v. 238, n. 1, p. 21–30, 2002.
- BODDEY, L. H. et al. **A Avaliação da Fixação Biológica de N_2 Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática**. Seropédica, 2007. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/622536>>
- BODDEY, R. M. et al. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, v. 174, n. 1–2, p. 195–209, 1995.
- BODDEY, R. M. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003.
- CANTARELLA, H.; ROSSETTO, Raffaella. FERTILIZERS FOR SUGARCANE.

Sugarcane Bioethanol - R & d For Productivity and Sustainability, São Paulo, p. 405-422, 2014. Editora Edgard Blucher.

CARVALHO, Eric Xavier de. **CICLAGEM DE NITROGÊNIO E ESTIMATIVA DE BIOMASSA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM PERNAMBUCO**. 2015. 71 f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares, Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

COELHO, C. H. M. et al. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 37–40, 2003.

COURTAILLAC, N. et al. Efficiency of nitrogen fertilizer in the sugarcane-vertical system in Guadeloupe according to growth and ratoon age of the cane. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 52, n. 1, p. 9–17, 1998.

ELIA NETO, André. Estado da Arte da Vinhaça. 2016. Disponível em: <<http://unica.com.br/download.php?idSecao=&id-21743421>> Acesso em: 31 ago 2017

FERREIRA, D. A. et al. Contribution of N from green harvest residues for sugarcane nutrition in Brazil. **GCB Bioenergy**, v. 8, n. 5, p. 859–866, 2016.

FRANCO, H. C. J. et al. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. spe, p. 2763–2770, 2008.

FRANCO, H. C. J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29–41, 2011.

FREITAS, A. D. S. et al. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rainfall gradient in Northeast Brazil. **Plant and Soil**, v. 391, n. 1–2, p. 109–122, 2015.

FREITAS, A. D. S. DE; SAMPAIO, E. V. DE S. B.; SANTOS, C. E. DE R. E S. Abundância natural do ¹⁵N para quantificação da fixação biológica do nitrogênio em plantas. In: FIGUEIREDO, M. V. B. et al. (Eds.). **Biotecnologia Aplicada à Agricultura - Textos de apoio e Protocolos Experimentais**. Brasília: p. 505–518., 2010.

GAVA, G. J. D. C. et al. Crescimento e acúmulo de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em solo coberto com palhada. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1347–1354, 2001.

GOVINDARAJAN, M. et al. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. **Plant and Soil**, v. 280, n. 1–2, p. 239–252, 2006.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, v. 311, n. 1–2, p. 1–18, 2008.

HOEFSLOOT, G. et al. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, v. 277, n. 1–2, p. 85–96, 2005.

HÖGBERG, P. Tansley Review No . 95 "& N natural abundance in soil – plant systems. **New Phytol.**, v. 137, n. 95, p. 179–203, 1997.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. & MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a

competitividade do produto brasileiro. **Embrapa**, p. 80, 2007.

KERBAUY, Gilberto Barbante. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LANDELL, M. G. A et al. Seleção de novas variedades de cana de açúcar e seu manejo de produção. **Encarte do Informações Agronômicas**, v. 110, p. 18–24, 2005.

LEDGARD, S. F.; FRENEY, J. R.; SIMPSON, J. R. Variations in natural enrichment of ^{15}N in the profiles of some Australian pasture soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 22, n. 2, p. 155–164, 1984.

LIMA NETO, J. F. et al. Avaliação agroindustrial e parâmetros genéticos de clones UFRPE de cana-de-açúcar no litoral norte de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, n. 1, p. 8–13, 2013.

LOSS, A. et al. Abundância natural de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ em sistemas de manejo conservacionista no cerrado. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 604–615, 2014.

MARTINELLI, L. A. et al. Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis. **São Paulo: Oficina de Textos**, p. 144, 2009.

MAULE, R. F.; MAZZA, J. A.; MARTHA JR., G. B. Produtividade agrícola de cultivares de cana-de-açúcar em diferentes solos e épocas de colheita. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 295–301, 2001.

MENDES, I. D. C. et al. 20 Perguntas e Respostas sobre Fixação Biológica de Nitrogênio. p. 19, 2010.

MONTAÑEZ, A. et al. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ^{15}N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 3, p. 253–263, 2009.

MONTAÑEZ, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21–28, 2012.

MORAIS, R. F. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 23–34, 2012.

MOREIRA, F. M. S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera. **Microbiologia E Bioquímica Do Solo**, p. 407–447, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; LAKSHMINARASIMHAN, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 2, p. 157–164, 1999.

OLIVEIRA, E. L. et al. Uso de vinhaça de alambique e nitrogênio em cana-de-açúcar irrigada e não irrigada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1398–1403, 2009.

OLIVEIRA, L. M. et al. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**,

v. 34, n. 1, p. 59–61, 2003.

OLIVEIRA, R. DE; DAROS, E.; ZAMBON, J. Área Foliar Em Três Cultivares De Cana-De-Açúcar E Sua Correlação Com a Produção De Biomassa. **Pesquisa**, v. 37, n. 2, p. 71–76, 2007.

ORLANDO FILHO, J.; MACEDO, N.; TOKESHI, H. Seja o doutor do seu canavial. **Informações Agronômicas**, n. 64, p. 1–6, 1994.

PEOPLES, M. B. B. et al. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. **Australian Centre for International Agricultural Research**, v. 11, p. 76, 1989.

PERIN, A. et al. Produção de fitomassa, acúmulo de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio por adubos verdes em cultivo isolado e consorciado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 35–40, 2004.

PERIN, L.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M. Diversidade de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isolada de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 8, p. 763–770, 2004.

POLIDORO, J. C. et al. Levantamento da contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar no Brasil. **Documentos**, 144, p. 8, 2001.

POLIDORO, José Carlos. **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na contribuição da fixação biológica de nitrogênio associada a cultura da cana-de-açúcar**. 186 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001

PRADO, R. D. M.; PANCELLI, M. A. Nutrição Nitrogenada em Soqueiras e a Qualidade Tecnológica da Cana-de-Açúcar. **STAB-Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 25, p. 2–4, 2006.

RAMOS, N. P. et al. Decomposição de palha de cana-de-açúcar recolhida em diferentes níveis após a colheita mecânica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1492–1500, 2016.

RAQUEL BARBOSA DE FARIAS, A. et al. Promoção de crescimento vegetal de feijão comum por bactérias isoladas. **Pesquisa Agropecuária pernambucana**, v. 17, n. September 2012, p. 101–104, 2012.

REIS, V. M. . et al. Fixação Biológica de Nitrogênio Simbiótica e Associativa. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). . **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2006. p. 153–172.

REIS JUNIOR, F. et al. Levantamento e quantificação de bactérias diazotróficas em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 985–994, 2000a.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v. 219, n. 1981, p. 153–159, 2000b.

RODRIGUES, J. R. **Fisiologia da cana-de-açúcar**. Botucatu: Unesp, 1995, 75p

SCHULTZ, N. et al. Efeito residual da adubação na cana-planta e da adubação nitrogenada e potássica na cana-soca colhidas com e sem a queima da palhada. **Revista**

Brasileira de Ciencia do Solo, v. 34, n. 3, p. 811–820, 2010.

SCHULTZ, N. et al. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 261–268, 2012.

SCHULTZ, N. **Fixação Biológica de Nitrogênio Associada à Cultura de Cana de Açúcar: Eficiência e Contribuição da Inoculação com Bactérias Diazotróficas**. 126 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SCHULTZ, N. et al. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407–414, 2014.

SCHULTZ, N. et al. Produtividade e diluição isotópica de ^{15}N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N_2 -Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural ^{15}N Abundance. **Review Aust. J. Plant Physiol**, v. 13, p. 699–756, 1986.

SILVA, A. P. M.; BONO, J. A. M.; PEREIRA, F. A. R. Aplicação de vinhaça na cultura da cana-de-açúcar: Efeito no solo e na produtividade de colmos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 1, p. 38–43, 2014.

SILVA, A. DA et al. Net and Potential Nitrogen Mineralization in Soil with Sugarcane Vinasse. **Sugar Tech**, v. 15, n. 2, p. 159–164, 2013.

SILVEIRA, E. Vinhaça na geração de energia. **Revista Fapesp**, n. 12, p. 68–71, 2015.

STEENHOUDT, O.; VANDEREYDEN, J. Azospirillum, free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.

TAULÉ, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 2011.

TAULÉ, C. et al. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 2012.

TRIVELIN, P. C. O. et al. Nitrogen losses of applied urea in the soil-plant system during two sugar cane cycles. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 193–201, 2002.

UNKOVICH, M. et al. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: 136, 2008.

URQUIAGA, S. et al. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Agronomia**, v. 37, n. 1, p. 55–58, 2003.

URQUIAGA, S. et al. Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data for the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 2012.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105, 1992.

URQUIAGA, S. S. **Fixação Biológica de Nitrogênio**, 2017. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_31_711200516717.html>

VALLES-DE LA MORA, B.; CADISCH, G.; ALUJA-SCHUNEMANN. COMPARACIÓN DE METODOLOGÍAS DE ISÓTOPOS PARA EVALUAR FIJACIÓN DE N ATMOSFÉRICO Y SU DESTINO EN SUELOS Y PLANTAS. **Agrociencia**, v. 37, n. 3, p. 117–128, 2003.

VIDEIRA, S. S. et al. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 51–66, 2012.

VIERA-VARGAS, M. S. et al. Use of different ¹⁵N labelling techniques to quantify the contribution of biological N₂ fixation to legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 9, p. 1185–1192, 1995.

VITTI, A. C. et al. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada com a localização de adubos nitrogenados aplicados sobre os resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, n. 3, p. 491–498, 2007.

XAVIER, Rogério Pontes. **Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na Produção Sustentável da Cultura de Cana-de-açúcar**. 2006. 71f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Agronomia (Ciência do Solo), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

YONEYAMA, T. et al. The natural ¹⁵N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, 1997.

ZAMBROSI, F. C. B. et al. Sugarcane performance under phosphorus deficiency: physiological responses and genotypic variation. **Plant and Soil**, v. 386, n. 1–2, p. 273–283, 2014.