

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio na
Produção Sustentável da Cultura de Cana-de-Açúcar.**

Rogério Pontes Xavier

2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**CONTRIBUIÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO NA
PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR**

ROGÉRIO PONTES XAVIER

Sob a orientação do Professor
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero

Tese submetida como requisito parcial para
obtenção do Grau de **Doutor em Ciências**, no
Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, Área
de Concentração em Produção Vegetal.

Seropédica, RJ

Abril de 2006

633.61

Xe

T

Xavier, Rogério Pontes, 1975

Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar / Rogério Pontes Xavier – 2007.

71 f. : il.

Orientador: Segundo Sacramento Urquiaga Caballero.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 66-75.

1. Cana-de-açúcar - Cultivo - Teses. 2. Nitrogênio - Fixação - Teses. I. Urquiaga Caballero, Segundo Sacramento, 1950. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

ROGÉRIO PONTES XAVIER

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM 25/04/2006

Segundo Sacramento Urquiaga Caballero. Ph.D. Embrapa Agrobiologia.
(Orientador)

Robert Michael Boddey. Ph.D. Embrapa Agrobiologia.

Fábio Lopes Olivares. Dr. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Fábio Bueno Reis Junior. Dr. Embrapa Cerrados.

José Carlos Polidoro. Dr. Embrapa Solos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que sempre iluminou meus caminhos;

À minha esposa Andréa por toda a sua paciência e companheirismo, e a minha filha Ana Clara, que foi um presente que Deus me deu, e que nos momentos mais difíceis me trouxe muita alegria e paz;

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã pelo carinho e complacência principalmente nos momentos mais complicados;

À toda minha família, especialmente minha avó Anita;

À FAPERJ, pela concessão de bolsa de estudo para realização dos meus estudos de doutorado.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ao Departamento de Fitotecnia e a seus professores.

Aos Professores e pesquisadores Segundo Urquiaga, Robert Michael Boddey e Bruno José R. Alves pela orientação.

À Embrapa Agrobiologia, por todo apoio de estrutura, financeiro e pessoal para a realização do trabalho.

Ao Pessoal do Laboratório de Nitrogênio (Zé Vicente, Altiberto, Roberto Grégio e Roberto Andrade), de Solos (Selmo, Flávio, Sidney) da Embrapa Agrobiologia. Ao pessoal de campo da Embrapa Agrobiologia.

À Diretoria da Usinas Itamarati que nos permitiu conciliar o desenvolvimento do presente trabalho com as atividades profissionais.

Aos grandes amigos Alexander Silva de Resende e Rafael Fiusa, pelo companheirismo, que foi muito importante para vencer as dificuldades que apareceram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos e colegas que eu conheci nos últimos 6 anos. Espero que eu consiga listar todos, e que a vida proporcione o reencontro sempre que for possível: Renato, Diego, Celso, Raimundo, David, Sérgio, Lincoln, Ednaldo, Ricardo Tarré, Octávio, Elvino, Gustavo, Jerri, Fabiano, Robert Macedo, Polidoro, Erika, Claudia, Roberta, Conceição, Ana Paula, Antonieta, Nazaré, Salomão, Adriano Perin, Marinete, Cristiane e Michele.

À todos que fizeram parte deste caminho, mesmo não estando aqui presente.

Muito obrigado!

RESUMO

XAVIER, Rogério Pontes. **Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar**. 2006. p. Tese (Doutorado em Agronomia, Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

Apesar dos esforços da pesquisa em FBN na cultura de cana-de-açúcar, que vem sendo desenvolvida no Brasil, as soqueiras da maioria das variedades de cana-de-açúcar ainda precisam de uma complementação com fertilizantes nitrogenados, e o custo deste insumo tende a elevar-se, acompanhando o preço do petróleo. Assim, nos últimos anos, a pesquisa científica, vem trabalhando em busca de alternativas à adubação nitrogenada, através de genótipos com maior potencial para FBN, práticas de manejo da cultura que poderiam amplificar a contribuição da FBN e pela seleção e inoculação de estirpes de bactérias eficientes para FBN. Buscando alcançar algumas dessas respostas, na Embrapa Agrobiologia, localizada em Seropédica-RJ, foram instalados três experimentos com o objetivo identificar as variedades de cana-de-açúcar mais eficientes para FBN, com base nas técnicas de balanço de N-total no sistema solo/planta, abundância natural de ^{15}N e diluição isotópica de ^{15}N . Os resultados desses experimentos permitiram concluir que: 1) o balanço de N-total do sistema solo-planta após 8 e 13 anos de cultivo foram positivos para a maioria das variedades estudadas, mostrando um significativo ingresso de nitrogênio proveniente da atmosfera via FBN para o sistema solo-planta; 2) os genótipos Krakatau, SP 70-1143, SP 79-2312 e SP 71-6163 confirmaram o potencial para FBN já observados em estudos anteriores; 3) as variedades RB 72-454, e RB 82-5336, RB 75-8540 e RB 83-5089 apresentaram alto potencial para FBN; 4) o tipo de solo e o ciclo da cultura teve grande influência na contribuição da FBN; e 5) a FBN é uma importante fonte de N ao sistema solo planta, e vislumbram a possibilidade de que com o manejo adequado (colheita de cana crua) e com a utilização de variedades eficientes para FBN, talvez, seja possível reduzir ou mesmo eliminar a adubação com fertilizantes nitrogenados na cultura.

Palavras chave: Quantificação da FBN; $\delta^{15}\text{N}$; Balanço de N

ABSTRACT

XAVIER, Rogério Pontes. **Biological's nitrogen fixation contribution in sugarcane's crop sustainable production.** 2006. 71p. Thesis (Doctor in Agronomy, Fitotecnic). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2006.

Despite sugarcane's Biological Nitrogen Fixation (BNF) research efforts which have been carrying on in Brazil, most of its varieties still need nitrogen fertilizer complement, and the cost of this supply trends to raise following the petroleum price. Thus, the scientific research has worked on finding alternatives to nitrogen fertilizer through varieties with higher potential to the BNF; crop's practical handling that would be able to increase BNF's contribution; and also, through selection and inoculation of bacteria's lineage efficient to BNF. Seeking some of these answers, three experiments were developed at Embrapa Agrobiologia in Seropédica-RJ heading to identify the most efficient sugarcane's varieties to BNF based on balance techniques of N-Total on the system soil/plant; ^{15}N natural abundance; and ^{15}N isotopic dilution. The experiment results allowed concluding that: 1) The N total balance of soil/plant system after 8 and 13 years of harvesting was positive to the most varieties studied, showing a significant entry of nitrogen from de atmosphere by BNF to the soil/plant system; 2) The varieties Krakatau, SP 70-1143, SP 79-2312 and SP 71- 6163 confirmed potential to BNF as observed on previous studies; 3) The varieties RB 72-454, RB 82-5336, RB 75-8540 and RB 83-5089 showed high potential to BNF. 4) The soil type and the crop's cycle have great influence on the BFN contribution; 5) The BNF is an important source of N for the soil/plant system; got a glimpse of right handling possibility (systems of sugar cane harvesting with crop residue remaining on the soil surface) and with the utilization of efficient varieties to BNF may be possible to reduce or even eliminate crop's nitrogen fertilizers.

Key words: quantifying BNF, $\delta^{15}\text{N}$, N balance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Histórico da fixação biológica de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar	3
2.2 Evidências da fixação biológica de nitrogênio e impacto na fertilidade do solo	4
2.3 Avanços da pesquisa envolvendo a fixação biológica de nitrogênio	5
2.4 Alguns dos fatores que afetam a fixação biológica de nitrogênio	6
2.5 Importância da fixação biológica de nitrogênio para o seqüestro de carbono	8
2.6 Técnicas de avaliação	9
2.6.1. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na nutrição nitrogenada da cultura de cana-de-açúcar	9
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 EXPERIMENTO 1. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em 10 variedades de cana-de-açúcar pelas técnicas de balanço de N total do sistema solo - planta e pela abundância natural de ¹⁵ N, em condições de campo.	13
3.1.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental	13
3.1.2 Adubação de Plantio e Manutenção.	13
3.1.3 Ciclos	14
3.1.4 Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio	14
3.1.5 Colheitas, Produção de Biomassa e Acúmulo de N-total	16
3.1.6 Procedimentos estatísticos	17
3.2 EXPERIMENTO 2. Avaliação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio em 9 variedades de cana- de-açúcar pela técnica de abundância natural de ¹⁵ N , em condições de campo.	17
3.2.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental	17
3.2.2 Adubação de Plantio e Manutenção	18
3.2.3 Colheitas, Produção de Biomassa e Acúmulo de N-total	18
3.2.4 Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio	18

3.3 EXPERIMENTO 3. Avaliação da potencialidade de 10 genótipos de cana de açúcar para fixação biológica de nitrogênio, pelo método de diluição isotópica de ¹⁵ N, num Argissolo Vermelho Amarelo.	18
3.3.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental	18
3.3.2 Colheitas, Produção de Biomassa e Acúmulo de N-total	20
3.3.3 Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 Experimento 1	23
4.2 Experimento 2	40
4.3 Experimento 3	50
5 CONCLUSÕES	61
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

A cultura de cana-de-açúcar exerce um papel de grande importância na economia de diversos países dos 5 continentes do mundo, tendo maior destaque nas economias da América Latina e Caribe. O Brasil é, atualmente, o maior produtor mundial desta cultura, que ocupa uma área de 5,7 milhões de hectares com uma produtividade média de 73 Mg/ha (IBGE-SIDRA, 2005). A história da cana-de-açúcar no Brasil confunde-se com a história do próprio País, uma vez que seu ciclo iniciou-se logo após a chegada dos portugueses, passando por oscilações desde o período colonial até os dias de hoje. No século XX, até o início da década de 70, o setor açucareiro passou por várias crises (Cana-de-açúcar, 1997). No entanto, em meados daquela década, o País implantou o maior programa de combustível biológico do mundo, o PROÁLCOOL, que além de atenuar a dependência brasileira pelo petróleo (na época, o País importava cerca de 84% de sua necessidade diária de petróleo), permitiria reduzir significativamente a emissão de monóxido de carbono em 57 %, a de hidrocarbonetos em 64 % e a de óxidos de nitrogênio em cerca de 13 % quando comparados com carros à gasolina da época (Bohm, 1986). Com o PROÁLCOOL, o País diminuiu a importação de petróleo no equivalente a 200.000 barris por dia, e em termos sócio-econômicos representou a criação de cerca de 1 milhão de empregos e ao redor de 1,0 bilhão de US Dólares por ano na economia de divisas.

Um dos fatores de primordial importância para o sucesso do programa PROÁLCOOL no Brasil, diz respeito ao balanço energético positivo da cultura de cana-de-açúcar para a produção de álcool. Ao contrário da cana produzida em países como EUA e Cuba (no passado recente) aonde o balanço energético raramente chega a +1 (Boddey, 1995), no Brasil é de aproximadamente +9, podendo chegar a +12 caso elimine-se a aplicação de fertilizante nitrogenado, diminuam-se as perdas industriais e haja um maior aproveitamento dos subprodutos da indústria (Macedo & Koller, 1997). Este grande balanço positivo, deve-se, em grande parte, aos bons rendimentos da cultura com baixas aplicações de fertilizantes nitrogenados (Urquiaga *et al.*, 1992). Em países produtores de cana-de-açúcar, como os Estados Unidos, Austrália, Cuba, Venezuela e Peru, as adições de fertilizantes nitrogenados estão entre 200 e 400 kg de N ha⁻¹ ano⁻¹.

Nos programas de melhoramento de cana-de-açúcar desenvolvidos no Brasil, como nos programas conduzidos mais recentemente pela Copersucar (SP) e também pelas Universidades Federais, as aplicações de fertilizante nitrogenado sempre foram modestas (ao redor de 60 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N) e as cultivares selecionadas produziram satisfatoriamente nestas condições, raramente mostrando grandes respostas às adições deste nutriente (Azeredo *et al.*, 1986). Assim, considera-se que, devido a estas baixas doses de N-fertilizante aplicadas, as pesquisas brasileiras contribuíram, e vêm contribuindo em grande parte, na seleção de cultivares de cana-de-açúcar para alta eficiência de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Urquiaga *et al.*, 1997).

Apesar dos esforços da pesquisa em FBN na cultura de cana que vem sendo desenvolvida no Brasil, as soqueiras da maioria das variedades de cana-de-açúcar ainda precisam de uma complementação nitrogenada e o custo de aquisição deste elemento tende a elevar-se, acompanhando a elevação dos preços do petróleo. Assim, nos últimos anos, a pesquisa científica, vem trabalhando em busca de alternativas para a adubação nitrogenada, através de genótipos com maior potencial para FBN (Urquiaga *et al.*, 1992, 1997), práticas usadas no manejo da cultura que poderiam amplificar a FBN (Resende, 2000; Xavier, 2002;

Polidoro, 2001), e pela seleção de estirpes de bactérias eficientes para FBN (Baldani et al., 1997; Boddey et al., 2001; Oliveira et al., 2002; Reis Jr., 2000).

Embora avanços tenham sido conseguidos, ainda não se tem um controle da FBN na cultura da cana. A pesquisa busca entender o processo, utilizando cultivares selecionadas pelo alto potencial para FBN. Porém, a renovação de cultivares é contínua, e pesquisas paralelas para avaliar aquelas que têm maiores chances de se beneficiarem da FBN precisam ser mantidas para garantir que inoculantes e diferentes formas de manejo incrementem a FBN, de modo que se tenham maiores chances de sucesso.

Este estudo teve como objetivo geral determinar a influência genotípica na contribuição da fixação biológica de nitrogênio. Em relação aos objetivos específicos pode-se citar a identificação de variedades de cana-de-açúcar mais eficientes para FBN, com base nas técnicas de balanço de N-total no sistema solo/planta, abundância natural de ^{15}N e diluição isotópica de ^{15}N .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da FBN na cultura de cana-de-açúcar

Desde os trabalhos pioneiros de Johanna Döbereiner no fim da década de 50, pesquisadores levantaram a hipótese de que microrganismos fixadores de N₂, poderiam desenvolver-se na rizosfera ou associados às plantas de cana e serem responsáveis por significativas contribuições de N proveniente da atmosfera para a nutrição das plantas. Naquela década, Döbereiner (1959, 1961) encontrou altos números de bactérias fixadoras de N₂ do gênero *Beijerinckia*, no solo dos canaviais, especialmente na região da rizosfera, a qual foi nomeada *Beijerinckia fluminensis* devido a sua alta ocorrência no Estado do Rio de Janeiro (Döbereiner e Ruschel, 1958). Na época, por falta de técnicas apropriadas, não foi possível quantificar adequadamente a contribuição às plantas desta fonte de nitrogênio.

Nos anos 70, vários experimentos foram conduzidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA, Piracicaba, SP) utilizando-se N₂ (gás) marcado com o isótopo ¹⁵N, onde foram detectadas contribuições significativas da fixação de N₂ às plantas de cana-de-açúcar (Ruschel *et al.*, 1978). Entretanto, devido às dificuldades envolvidas em expor, por longo tempo, no campo, plantas de cana-de-açúcar ao gás marcado com o isótopo, não foi possível concluir, se estas contribuições teriam significância agrônômica. Praticamente no mesmo período, com a introdução do meio de cultivo semi-sólido para isolamento de bactérias, houve a possibilidade de descoberta de novos gêneros de bactérias diazotróficas (Döbereiner, 1992), não só em cana-de-açúcar, como em várias outras gramíneas. Entre estas bactérias, pode-se destacar para a cana-de-açúcar, *Azospirillum* spp, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Burkholderia* spp e *Gluconacetobacter diazotrophicus* (anteriormente conhecida como *Acetobacter diazotrophicus*), que foram isoladas dos tecidos das plantas, tanto nas raízes como nos colmos e folhas (Baldani *et al.*, 1986; Cavalcante e Döbereiner, 1988; Boddey *et al.*, 1991, 1995; Baldani *et al.*, 1996; Reis *et al.*, 2000; Reis Júnior, 2000; Sevilla and Kennedy, 2000; Kennedy and Islam, 2001; Kennedy *et al.*, 2004). Estas bactérias possuem características favoráveis, que levaram a acreditar que sejam as principais responsáveis pelas altas taxas de FBN associadas a cultura de cana-de-açúcar (Baldani *et al.*, 1997), chegando a fixar até 150 kg ha⁻¹ de N (Döbereiner, 1997; Kennedy *et al.*, 2004). *G. diazotrophicus* e *Herbaspirillum* spp., não são encontrados em vida livre no solo, mesmo de áreas das entrelinhas de plantações de cana-de-açúcar, sendo encontradas somente em raízes, colmos e folhas de cana-de-açúcar. Assim, estas espécies são conhecidas como bactérias endofíticas obrigatórias (Baldani *et al.*, 1997). Dados de Caruso & Baldani (1995) indicaram que *G. diazotrophicus* inoculada num solo, não pode ser re-isolada após 48 horas da inoculação, sendo bem mais sensível que *Herbaspirillum* spp para sobreviver no solo. Uma forte razão para se acreditar que as bactérias diazotróficas que vivem no interior das plantas de cana sejam as principais responsáveis pela FBN nesta cultura, é a possibilidade das bactérias disporem de fotossintatos em abundância, estarem num ambiente com baixa concentração de O₂, e, estando nestas condições, o N fixado poderia ser rapidamente assimilado pela planta hospedeira (Reis Júnior, 1998). Experimentos em laboratório, onde foram cultivados juntos, em meio de cultura, *G. diazotrophicus* e uma levedura amilolítica (*Lipomyces kononemkoe*), usado como um sistema modelo para representar a interação planta/bactéria, mostraram que 50% do N-total fixado pela bactéria foi transferido para a levedura, desde o início de crescimento da cultura, o que sugere que esta rápida transferência também pode ocorrer para a planta hospedeira (Cojho *et al.*, 1993). Cruz *et al.* (1995), determinaram em laboratório que o produto excretado por *G. diazotrophicus* é o amônio, o que reforça ainda mais essa hipótese.

Já no fim da década de 80, em trabalhos conduzidos na EMBRAPA-Agrobiologia em ótimas condições de irrigação e de fertilização, excetuando-se aí o nitrogênio, e fazendo uso das técnicas de balanço de N total e diluição isotópica de ^{15}N , foi comprovado que várias cultivares de cana-de-açúcar são capazes de obter grandes contribuições de N derivado da fixação biológica de nitrogênio associada à cultura (Lima *et al.*, 1987; Urquiaga *et al.*, 1989; 1992).

É sabido que plantas como a cana-de-açúcar que apresentam via fotossintética C_4 , utilizam menos de 50% de sua capacidade de fotossíntese (Machado, 1987), podendo assim, otimizando a fixação de CO_2 , oferecer para as bactérias diazotróficas a energia necessária para manter a FBN sem afetar o rendimento da cultura (Döbereiner, 1992). No entanto, os mecanismos que envolvem a colonização das plantas pelas bactérias fixadoras de N_2 , ainda não estão totalmente elucidados (Olivares *et al.*, 1997). Sabe-se que em cana-de-açúcar, estas bactérias podem ser transferidas nos “toletes” que servem como propágulo, havendo também a possibilidade de que associações micorrízicas tenham um papel importante na infecção das plantas por estas bactérias, como foi demonstrado para a espécie *G. diazotrophicus* por Paula *et al.*, (1991). No entanto, ainda não é possível afirmar que realmente sejam somente essas, as bactérias responsáveis pela FBN na cultura.

As recentes evidências, indicam que a FBN pode contribuir significativamente em até 60% de todo o N acumulado pelas plantas de cana-de-açúcar (Boddey *et al.*, 2001; Xavier, 2002), dependendo do genótipo da planta e sua interação com os diversos gêneros de bactérias diazotróficas associativas (Reis *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002). No estudo realizado por Polidoro (2001), foi observado que altos níveis de contribuição da FBN são observados em várias plantações comerciais de cana distribuídas em quatro Estados brasileiros. Estes resultados corroboram com os obtidos por Yoneyama *et al.*, (1997) que avaliaram a contribuição da FBN em variedades de cana de diferentes regiões canavieiras e faz com que o Brasil seja visto como o líder em substituir o adubo nitrogenado de fontes fósseis, pela FBN na cultura de cana-de-açúcar, principalmente quando considera-se os níveis atuais de adubação e a demanda da cultura (Kennedy *et al.*, 2004).

2.2 Evidências da FBN e impacto na fertilidade do solo

A cultura de cana-de-açúcar apresenta alta extração de nitrogênio, e precisa acumular ao redor de 200 kg ha^{-1} deste nutriente para atingir uma produtividade de 100 Mg ha^{-1} em cana planta, e entre 120 a 180 kg ha^{-1} de N nas socarias (Orlando Filho *et al.*, 1980). Sendo o nitrogênio contido no colmo exportado para a usina e, a palha da cana geralmente queimada antes do corte para facilitar a colheita manual, o cultivo contínuo de cana deveria esgotar rapidamente as reservas de nitrogênio do solo, por mais fértil que ele fosse, uma vez que as quantidades deste nutriente adicionadas anualmente, raramente ultrapassam 80 kg ha^{-1} nas socarias e na cana-planta este valor é inferior a 30 kg ha^{-1} (Resende, 2000; Xavier, 2002).

Entretanto, conforme os dados apresentados por Resende (2003) onde foi efetuado um balanço de N na cultura de cana-de-açúcar, após 16 anos de cultivo na Usina Cruangi em Timbaúba-PE, observa-se que em geral a cultura de cana não reduz significativamente o nível de N do solo, mostrando um balanço positivo mesmo quando não foi adicionado N-fertilizante ao sistema.

Estas evidências indicam que a cultura possui um sistema natural de reposição do N exportado do solo anualmente com os colmos (Olivares, 1997) e diversos autores atribuem estes resultados a fixação biológica de nitrogênio, que é capaz de suprir boa parte da necessidade nitrogenada da cultura de cana (Döbereiner, 1959, Lima *et al.*, 1987, Urquiaga *et*

al., 1992, Yoneyama, 1997, Resende, 2000, Polidoro *et al.*, 2001).

No trabalho de Resende (2003), desenvolvido em Pernambuco, a estimativa da contribuição da FBN para as plantas, chegou a 32%. Este percentual é relativamente baixo quando comparado com os resultados de outros autores (Urquiaga *et al.*, 1992, Yoneyama, 1997, Resende, 2000, Polidoro *et al.*, 2001), mas muito promissor uma vez que representa não um valor num ano isolado e sim um valor médio de todos os 16 anos em que o experimento foi conduzido, incluindo aí, os anos de seca prolongada. Torna-se ainda mais promissor quando considera-se que a resposta a adubação nitrogenada só foi encontrada em 5 das 14 colheitas realizadas, indicando a necessidade de se buscar um melhor entendimento do sistema visando otimizar o potencial de contribuição da FBN ou racionalizar a adubação nitrogenada.

Esse ingresso de nitrogênio via FBN confirma o resultado do trabalho desenvolvido por Lima *et al.* (1987), que trabalhando com a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , fez um balanço de nitrogênio em quatro variedades de cana-de-açúcar durante dois ciclos. Esse estudo foi desenvolvido em potes com 64 kg de solo, sendo o conteúdo de nitrogênio igual a 52 g N pote⁻¹. Em relação ao resultado desse estudo, no primeiro e segundo ano, a variedade CB 47-89, acumulou 16,5g e 13,8g de N pote⁻¹, respectivamente. Incluindo as raízes, essa variedade acumulou nesses dois anos 34,8g de nitrogênio, enquanto o decréscimo observado no solo foi de apenas 6,8g N pote⁻¹. Mesmo incluindo, os 2,65g N adicionados na forma de uréia marcada com ^{15}N , o grande balanço positivo (25,3g N pote⁻¹), mostrou o grande ingresso de nitrogênio proveniente da atmosfera via FBN. Nos potes onde não havia nenhuma variedade de cana plantada (Testemunha), foi observado um balanço negativo, mostrando uma perda de quase 10g N pote⁻¹. O fato das variedades IAC 52-150 e NA 56-79, mostrar um pequeno e insignificante balanço positivo de nitrogênio demonstra mais uma vez o forte efeito que o genótipo da planta pode exercer sobre a eficiência da fixação de N_2 (Urquiaga *et al.*, 1992; Reis Júnior *et al.*, 2000).

Uma outra provável evidência da reposição de nitrogênio pela associação com bactérias diazotróficas endofíticas está no fato de que apesar da cultura de cana-de-açúcar demandar uma grande quantidade de nitrogênio, a cultura apresenta uma baixa resposta à adubação nitrogenada (Carnaúba, 1989; Trivelin *et al.*, 1995, 1996; Gava *et al.*, 2001). Um reforço para esta hipótese é o trabalho de Azeredo *et al.* (1986), que estudando a aplicação de nitrogênio em cana planta, em diferentes regiões canavieiras do Brasil, encontrou resposta significativa na produção de colmos em apenas 19 % dos experimentos. Com a evolução do melhoramento genético de plantas na cultura de cana-de-açúcar, surge a necessidade de atualizar este levantamento de Azeredo, visando saber qual o comportamento médio das cultivares que vem sendo plantadas atualmente.

2.3 Avanços da pesquisa envolvendo a Fixação Biológica de Nitrogênio em cana-de-açúcar

Pesquisas tem demonstrado que a inoculação com *G. diazotrophicus* em diferentes genótipos de cana-de-açúcar (principalmente nas cultivares RBs) podem provocar uma série de mudanças anatômicas e fisiológicas na planta hospedeira. Dentre essas mudanças pode-se citar uma aumento das raízes laterais assim como mudanças na geometria das raízes pelo aumento da proporção de raízes finas e do sistema radicular como um todo (Olivares *et al.*, 2002). As mudanças fisiológicas que acontecem na cultura de cana-de-açúcar durante as interações com bactérias endofíticas, podem ser, em parte, relacionados com a promoção do crescimento, que tem sido observado em muitos estudos (Baldani, 2005).

Em relação aos mecanismos moleculares envolvidos na interação planta bactéria, os estudos têm demonstrado que a cana-de-açúcar pode estar envolvida ativamente nessa associação, isto porque vários genes presentes em diferentes processos fisiológicos podem ser diferentemente expressos durante a associação com bactérias endofíticas (Nogueira *et al.* 2001). Os estudos tem avançado, buscando novos focos, como a caracterização dos sinais pelos quais as plantas de cana-de-açúcar podem decifrar os sinais das bactérias e responder com uma associação eficiente (Vargas *et al.*, 2003); e também os mecanismos moleculares envolvidos que promovem um crescimento da planta quando essa se associa com as bactérias endofíticas.

O potencial econômico da utilização de *G. diazotrophicus* na inoculação de plantas de cana-de-açúcar cultivadas no estado do Rio de Janeiro, estimulou a criação de uma rede para sequenciamento do genoma/proteoma dessa bactéria. Esse sequenciamento, que deve ficar pronto até o final desse ano, será muito importante para entender o funcionamento dos genes e consequentemente a sua manipulação para aumentar a eficiência da interação planta/bactéria e também da fixação biológica de nitrogênio.

2.4 Alguns dos fatores que afetam a fixação biológica de nitrogênio

A FBN é influenciada diretamente com maior ou menor intensidade por alguns fatores como: umidade, disponibilidade de molibdênio, genótipo, aplicação de nitrogênio, meio de propagação da planta (micropropagação), entre outros.

Umidade

Em estudos que avaliam o processo de FBN associado às plantas, a disponibilidade de água, fundamental para qualquer processo biológico, deve ser colocado em primeiro plano. Já foi constatado que a atividade da fixação de N₂ associada tanto a leguminosas como as não leguminosas, é estimulada por altos níveis de umidade do solo (Weier, 1980; Wani *et al.*, 1983; Boddey e Döbereiner, 1984).

Molibdênio

Outro fator muito importante para a otimização do processo de FBN, consiste na nutrição adequada das plantas com micronutrientes, especialmente molibdênio, uma vez que este elemento é essencial para a síntese e atividade da enzima nitrogenase, responsável pela FBN, e da redutase do nitrato, que possibilita a assimilação do nitrato derivado do solo ou fertilização, pela planta (Polidoro, 2001). Trabalhos realizados por Urquiaga *et al.*, (1996, 1999), indicam aumento significativo da produção de colmos com a aplicação de 1 kg ha⁻¹ de molibdato de sódio, em solos com baixa disponibilidade deste nutriente, onde claramente o Mo reduziu a necessidade de aplicação de N-fertilizante. Este fato ficou mais claro em um recente trabalho realizado por Polidoro (2001), onde a variedade de cana-de-açúcar RB 72-454 respondeu tanto a adição de molibdênio quanto a adição de nitrogênio, porém a aplicação isolada de 100 g ha⁻¹ de Mo apresentou o mesmo aumento de produção de colmos que a aplicação de 60 kg ha⁻¹ de N. Os resultados observados pelo efeito isolado do Mo dentro dos níveis de N, reforça a importância da adoção da prática de aplicação de Mo na cultura da cana-de-açúcar, uma vez que, neste caso, a aplicação da maior dose de Mo (400 g ha⁻¹) ocasionou produtividade maior que a aplicação de 120 kg ha⁻¹ de N isoladamente.

Embora a nitrogenase dependente do Mo seja a mais conhecida, já se sabe que existem pelo menos mais dois tipos de nitrogenase: uma em que o vanádio substitui o Mo (V-dependente) e uma que só tem ferro (Fe-dependente ou nitrogenase alternativa) (Alves *et al.*, 2004).

Genótipo

Outro aspecto a ser observado quando se trata de FBN em espécies não leguminosas é o forte efeito que o genótipo da planta pode exercer sobre a eficiência da fixação de N₂ (Reis Júnior *et al.*, 2000). Oliveira (1994), aplicando o método de diluição isotópica de ¹⁵N em 40 cultivares de arroz inundado, encontrou diferenças consideráveis no percentual de N fixado, este fato também foi observado para ecótipos de *Panicum maximum*, milho, trigo e cana-de-açúcar (Miranda *et al.*, 1990; Salomone & Döbereiner, 1996; Zavalin *et al.*, 1997; Urquiaga *et al.*, 1992). Urquiaga *et al.* (1992) encontraram que os cultivares comerciais de cana-de-açúcar CB 45-3 e SP 70-1143, apresentaram valores médios de FBN (3 anos de estudo) ao redor de 60% do total de N acumulado pela planta, enquanto SP 79-2312, Na 56-79, CB 47-89, SP 71-799 e IAC 52-150, obtiveram valores bem menores. Experimentos realizados por Reis Júnior (1998; 2000), buscando encontrar respostas para estas diferenças varietais relacionadas com a FBN, e baseando-se na hipótese de que variedades diferentes apresentariam características distintas em relação a população de bactérias diazotróficas endófitas, tanto qualitativa como quantitativamente, chegou a conclusão que todas as bactérias estudadas puderam ser isoladas em proporções similares nos 4 genótipos avaliados, tanto nas cultivares eficientes como SP 70-1143 e CB 45-3, como na variedade Chunnee (*Saccharum barberi*), comprovadamente de baixa eficiência para a fixação biológica de N₂.

Estando as bactérias dentro da planta, é preciso intensificar os estudos no sentido de procurar entender os fatores que afetam a associação planta-bactérias diazotróficas na cultura da cana-de-açúcar, fazendo com que o processo de FBN seja efetivo em alguns cultivares e atenuado em outros. De acordo com Reis Júnior (2000) algumas hipóteses podem ser sugeridas para explicar a variação entre os genótipos das plantas em relação as taxas de FBN: 1) mesmo os genótipos apresentando números similares de populações de diazotróficos na planta, há a possibilidade de que a interação planta x microrganismos seja diferente nos genótipos como proposto por Salomone & Döbereiner (1996). Deve-se ressaltar também que a eficiência fotossintética, as exigências nutricionais e a resistência às condições desfavoráveis, entre outras, são características ligadas ao genótipo das plantas que podem apresentar influência na eficiência da FBN; 2) A diversidade genética de bactérias diazotróficas da mesma espécie (estirpe) em interação com o genótipo da planta (Piñero *et al.*, 1988; Combe *et al.*, 1994) também deve ser considerada como um fator importante ao se analisarem as diferenças varietais em relação à FBN na cultura de cana-de-açúcar; 3) Deve ser lembrado que o número de bactérias conhecidas, como também o número de bactérias que são culturáveis é muito pequeno. Estima-se que menos de 10% do total de microrganismos existentes sejam conhecidos (Amann *et al.*, 1994), e portanto, outra possibilidade, que também não pode ser descartada, poderia estar relacionada com a presença de bactérias ainda não descritas, estarem contribuindo também para FBN. É fato que a fixação biológica de nitrogênio em plantas de cana-de-açúcar é um processo complexo e que envolve uma gama de fatores relacionados com o genótipo das plantas e das bactérias associadas a estas. As hipóteses sugeridas acima devem ser analisadas em conjunto, e somadas a outras que podem vir a ser apresentadas, para que se possa compreender os fenômenos que regem essa associação. Isto servirá não apenas para otimizar o processo, como também para viabilizar sua extensão a outras culturas.

Nitrogênio

Alguns autores (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993; Muthukumarasamy *et al.*, 1999; Reis Júnior *et al.*, 2000; Muthukumarasamy *et al.*, 2002), têm observado que plantas de cana crescendo em solos adubados com altas doses de N fertilizante apresentam redução na população de bactérias diazotróficas embora o rendimento mantenha-se estável. Assim, pode-se deduzir que a FBN associada a culturas não leguminosas, como a cana-de-açúcar, funciona de forma complementar a disponibilidade de N do solo, sendo similar ao que ocorre com leguminosas, mas isto ainda precisa ser melhor compreendido, uma vez que algumas bactérias diazotróficas, como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, que não possui nitrato redutase, pode fixar N₂ do ar mesmo em condições de alto conteúdo de NO₃ (25mM) no meio de cultura (Teixeira *et al.*, 1987; Boddey *et al.*, 1991).

Um resultado bastante interessante no que diz respeito a aplicação de nitrogênio foi que a utilização de eletroforese de enzima multilocus para determinar a diversidade genética, encontrou sete tipos distintos de perfis eletroforéticos nos isolados de *Gluconacetobacter diazotrophicus* provenientes de plantas de cana-de-açúcar cultivados no Brasil com baixas doses de nitrogênio, porém somente um perfil nos isolados provenientes do México, onde se aplicam altas doses de nitrogênio fertilizante. Estes resultados sugerem que a diversidade genética das espécies de bactérias diazotróficas que vivem endofiticamente na cultura de cana-de-açúcar, podem ser perdidas devido as aplicações freqüentes de altas doses de nitrogênio aplicados, como ocorre no México (Caballero-Mellado *et al.*, 1995).

Meio de Propagação (Micropropagação)

A comercialização de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil a partir da década de 80 com o objetivo de produzir mudas com as características originais do genótipo e de excelente grau de fitossanidade (Canuto *et al.*, 2003). Entretanto o processo de micropropagação além de eliminar os microrganismos patogênicos, também promove a eliminação de bactérias endofíticas benéficas (Moraes e Tauk-tornisielo, 1997). A reintrodução de bactérias endofíticas em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar tem auxiliado os estudos da associação entre as plantas e as bactérias diazotróficas, e tem permitido avaliar o potencial de FBN e de promoção de crescimento devido a inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas (Reis *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2002; Canuto *et al.*, 2003). Estudo recente realizado por Oliveira *et al.* (2002) utilizando plantas micropropagadas tem demonstrado um valor máximo de contribuição da FBN de 30% do N total acumulado pelas plantas, sendo este resultado obtido quando se inocula uma mistura de cinco estirpes de bactérias diazotróficas. Este estudo demonstra o efeito positivo da interação de diversas bactérias diazotróficas na FBN na cultura de cana-de-açúcar. Disto deduz-se que várias são as bactérias diazotróficas que interagem favoravelmente neste processo.

2.5 Importância da FBN para o seqüestro de carbono

Admitindo-se o potencial de redução nas emissões de CO₂ para a atmosfera, via seqüestro de carbono, seja pela parte aérea dos vegetais ou pela incorporação na matéria orgânica do solo, a fixação biológica de nitrogênio ocupa papel de grande destaque. Na fabricação de uma tonelada de fertilizante nitrogenado é necessária uma energia equivalente a aproximadamente 15000 Mcal (o que equivale 820 kg de C), que normalmente é obtida via queima de combustíveis fósseis (Macedo, 1998; Lal, 2002). Neste sentido a utilização de

espécies vegetais para o seqüestro de carbono que sejam capazes de receber parte ou todo o nitrogênio necessário ao seu desenvolvimento via FBN é de fundamental importância, não somente do ponto de vista ambiental como do ponto de vista econômico, uma vez que o nitrogênio é, para a maioria das espécies, o elemento mineral de maior demanda.

2.6 -Técnicas de avaliação

Para que se possa avaliar com maior precisão a contribuição da FBN na cultura da cana-de-açúcar é necessário o uso de algumas técnicas específicas. Assim, segue uma breve descrição das técnicas utilizadas neste estudo.

2.6.1. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na nutrição nitrogenada da cultura de cana-de-açúcar

Nos últimos anos têm sido desenvolvidos e adaptados uma série de métodos com o objetivo de quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio na nutrição das plantas. As metodologias disponíveis são: a diferença de N-total (Boddey, 1987), redução de acetileno (Burris, 1975), balanço de N-mineral (Alves *et al.*, 1994) e também técnicas isotópicas, tais como: N₂ marcado com ¹³N ou ¹⁵N (Ruschel *et al.*, 1978), a diluição isotópica de ¹⁵N (Vallis *et al.*, 1967; Boddey *et al.*, 1994) e a abundância natural de ¹⁵N (Shearer & Kohl, 1986). Cada metodologia possui vantagens e desvantagens em relação às outras.

Neste estudo foi utilizado o balanço de nitrogênio no sistema solo-planta, a técnica de diluição isotópica de ¹⁵N e abundância natural de ¹⁵N,

Balanço de nitrogênio no sistema solo-planta

Esta técnica é bastante difundida no meio científico e baseia-se em medir as entradas e saídas de N no sistema solo-planta-atmosfera, calculando-se a diferença entre ambos e obtendo-se ganhos significativos de N quando ocorre a FBN. O balanço deve incluir todas as entradas e saídas de N, incluindo-se fertilizantes, N das chuvas, da água de irrigação, do lençol freático, da lixiviação, da desnitrificação, da volatilização de amônia, etc., monitorando-se assim todas as formas sólidas, dissolvidas e gasosas de nitrogênio (Boddey, 1987). Entretanto, tais medições são difíceis de serem obtidas na prática, o que vem acarretando no não monitoramento das formas gasosas de N e muitas vezes das perdas por lixiviação.

Solos ricos em N tendem a aumentar os erros da estimativa da FBN, pois o N acumulado nas plantas é muito inferior ao nitrogênio total presente no solo. Erros associados a estimativa da densidade do solo, a amostragem e análise de N afetam grandemente o cálculo do balanço. Um erro de 5%, bastante aceitável em análises laboratoriais, pode corresponder a 100-200 kg ha⁻¹ de N (Alves *et al.*, 1994). O erro da estimativa do balanço é o somatório dos erros envolvidos em cada estimativa de entrada/saída de N de todas fontes/drenos (Boddey, 1987). Devido a esta variabilidade, é desejável a continuação do experimento por longos períodos para que o erro seja inferior a magnitude da mudança do conteúdo de N em um determinado período.

O uso de substratos pobres em N total (vermiculita, horizontes inferiores de solos tropicais, etc.), em relação a um solo normal, aumenta a sensibilidade do método, não obstante as condições de crescimento das plantas serem atípicas. Preferivelmente, os experimentos de quantificação com balanço de N devem ser de longa duração em solos pobres em N e em condições de campo, obtendo-se estimativas mais realistas das entradas e

saídas de N no sistema. São poucos os estudos de balanço de N em campo, porém, que monitoram todas essas entradas e podem ser considerados verdadeiros balanços de N (Boddey, 1987).

Diluição isotópica de ^{15}N

Atualmente a técnica disponível mais aceita no meio científico para quantificar a FBN numa cultura é a da diluição isotópica de ^{15}N (Boddey & Urquiaga, 1992). Esta técnica tem a vantagem de ser integrativa, permitindo quantificar a contribuição da FBN no ciclo da cultura, do plantio até a colheita, e de se avaliar o N fixado que foi incorporado dentro da planta. Por esta técnica então, pode-se medir o benefício da FBN durante o crescimento das plantas (Peoples *et al.*, 1989).

A técnica baseia-se 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 (át.% $^{15}\text{N} > 0,3663$) em proporção conhecida, ou seja, adubos marcados. Plantas que só obtenham nitrogênio do solo marcado possuirão um enriquecimento em ^{15}N semelhante ao deste solo. Por outro lado, plantas que obtenham além do N marcado proveniente do solo, N atmosférico (não marcado), sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N . Quanto maior a magnitude da diluição, maior a quantidade de N atmosférico incorporado e, por conseguinte, maior a contribuição da FBN.

A aplicação da técnica de diluição isotópica de ^{15}N depende de uma premissa básica: as plantas fixadoras e testemunha devem absorver nitrogênio do solo com a mesma marcação. Para satisfazer essa condição é necessário ou que a marcação de ^{15}N do solo seja constante em profundidade e em tempo ou que as plantas fixadora e testemunha tenham marcha de absorção de nitrogênio do solo idênticas (Boddey, 1987). Além disso, outras entradas de nitrogênio no sistema solo-planta como água de irrigação, chuvas, agroquímicos, fertilizantes nitrogenados devam ser de magnitudes desprezíveis, ou iguais tanto para a planta fixadora de N_2 como para a planta testemunha. O nitrogênio total e o enriquecimento de ^{15}N contido nas sementes e mudas devem ser quantificados e levados em consideração, especialmente em leguminosas que forem colhidas precocemente, pois neste caso tais valores podem ser de tal magnitude que diluam (ou concentrem, no caso de semente enriquecida) a composição isotópica das plantas assim colhidas (Witty *et al.*, 1991). A planta testemunha não deve fixar nenhum “nitrogênio atmosférico”, ou a quantidade de nitrogênio fixado deve ser desprezível em relação à quantidade fixada pela planta teste.

A quantificação (%) da Fixação Biológica de Nitrogênio através da técnica de diluição isotópica de ^{15}N é calculada conforme a equação abaixo:

$$\% \text{Ndfa} = \left[1 - \left(\frac{\text{átomos \% de } ^{15}\text{N em excesso na planta teste}}{\text{átomos \% de } ^{15}\text{N em excesso na planta testemunha}} \right) \right] \times 100$$

Onde: átomos % em excesso = át.% ^{15}N total - 0,3663 % .

As estimativas da fixação biológica de nitrogênio usando-se a técnica de diluição isotópica de ^{15}N com espécies não leguminosas são relativamente recentes. Em gramíneas, a técnica tem sido aplicada em forrageiras (Boddey & Victoria, 1986), cana-de-açúcar (Lima, 1987) e arroz (Oliveira, 1994; Campos, 1999). E nestes casos, devido a contribuição da FBN normalmente ser menor para estas espécies de plantas, a escolha da planta controle deve apresentar ainda, maior rigor.

Escolha da planta controle

A utilização do crescimento simultâneo de uma planta referência (não fixadora) com a planta teste é justificado para que esta planta possibilite uma amostragem natural do enriquecimento do ^{15}N disponível no solo. Esta característica possibilita a “amostragem” do solo de forma integrativa e não somente de forma pontual como seria o caso da amostragem direta do solo pura e simplesmente. No entanto, para que esta planta controle possa realmente expressar esta condição da melhor forma possível, algumas características se fazem necessárias.

Caso houvesse segurança em se afirmar que a marcação em ^{15}N do solo fosse estável em profundidade, e ao longo do tempo, qualquer planta não-fixadora poderia ser utilizada como testemunha. Entretanto, tal estabilidade é extremamente difícil de se obter em condições de campo, devido a dinâmica do nitrogênio no solo. A diferença em enriquecimento de ^{15}N em profundidade e distância do local de aplicação do adubo marcado (variação espacial) pode ser resultado da não homogeneização do solo com o adubo. Nestas condições, plantas que explorem diferentes volumes de solo absorverão N com diferentes enriquecimentos, levando a estimativas errôneas da FBN (Boddey & Victoria, 1986; Peoples *et al.*, 1989). Visando-se eliminar ou reduzir este erro, algumas alternativas têm sido propostas. No caso de leguminosas, a utilização de testemunhas da mesma espécie botânica da planta teste, porém de variedades não nodulantes (ex: soja não nodulante) parece ser uma solução apropriada. Não havendo variedade não fixadora disponível, a testemunha deve possuir um sistema radicular semelhante, que explore o mesmo volume de solo. Em forrageiras, as espécies *Brachiaria arrecta* e *Panicum maximum* cv. KK-16 mostraram-se adequadas para servir de controle não-fixador em condições de vaso, face aos mínimos valores de contribuição da FBN relatados (Boddey & Victoria, 1986; Miranda *et al.*, 1990). Oliveira *et al.* (1992) utilizaram várias plantas testemunhas de espécies diferentes para quantificar a FBN em feijão inoculado e concluíram que a utilização de mais de uma testemunha é uma boa estratégia para estimar a contribuição da FBN na planta teste. Entretanto, quando estas condições não são viáveis, a melhor solução é a máxima homogeneização da marcação do solo em profundidade e tempo.

Abundância natural de ^{15}N

Nos últimos anos a técnica da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) vem ganhando destaque em nível de campo, principalmente com o aperfeiçoamento da sensibilidade dos espectrômetros de massa. Esta técnica baseia-se no fato de que geralmente, o N do solo é levemente enriquecido com o isótopo ^{15}N em comparação ao N_2 do ar (Shearer & Kohl, 1986). O nitrogênio do ar apresenta cerca de 0,3663% de ^{15}N e o restante (99,6337%) de ^{14}N (Junk & Svec, 1958, citados por Alves, 1996). No entanto, devido a discriminação isotópica que ocorre durante as transformações do nitrogênio no sistema solo-planta, ambos podem apresentar valores de ^{15}N um pouco maiores que os encontrados na atmosfera (Shearer & Kohl, 1986). Estas variações são extremamente pequenas, então se convencionou que cada unidade de delta ^{15}N seria a abundância natural dividida por mil, ou seja, 0,0003663 átomos

% de ^{15}N em excesso. Espécies capazes de obter do ar a maior parte do nitrogênio necessário para sua nutrição, apresentarão valores de $\delta^{15}\text{N}$ bem próximos a zero, uma vez que a maior parte virá do N do ar que, é o padrão da técnica, e possui 0,3663 % de ^{15}N , ou seja, zero unidades de delta ^{15}N em excesso. Por outro lado, as espécies não fixadoras crescendo no mesmo solo, terão valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento será derivado do solo.

Esta técnica, como todas as outras utilizadas na determinação da contribuição da FBN para as plantas, também apresenta limitações, exigindo algumas considerações. Assim como as outras técnicas isotópicas, essa depende da premissa básica de que as plantas fixadoras e não-fixadoras, crescendo no mesmo solo, absorvam nitrogênio com a mesma marcação com ^{15}N (Shearer & Kohl, 1986). Esta limitação pode ser contornada selecionando-se espécies-referência, com desenvolvimento radicular e demanda de N semelhantes à planta avaliada. Outra limitação do método consiste no alto custo das análises e a necessidade de um maior cuidado com a manipulação das amostras (Boddey, 1987). Além das dificuldades descritas acima, é importante considerar também os valores de fracionamento isotópico (valor B) das plantas fixadoras crescendo em meios livres de N. Estas variações se dão ao nível de espécie da planta, das estirpes das bactérias diazotróficas envolvidas, e do estágio e condições de crescimento. Sendo assim, é necessário que se utilize um fator de correção, (valor B), que possa expressar a discriminação isotópica de ^{15}N feita por cada espécie (Peoples *et al.*, 1989). Por outro lado, as diferenças que possam existir na exploração do volume do solo pelas raízes das plantas teste e controle e as diferenças na curva de absorção de nutrientes entre elas, são fatores que permitem sugerir o uso de mais de uma planta como referência (Shearer & Kohl, 1986). Ainda assim, o uso desta técnica com os devidos cuidados descritos acima, normalmente apresenta altas correlações com a técnica de diluição isotópica de ^{15}N com aplicação de ^{15}N -fertilizante na marcação do solo, que é atualmente, a técnica mais difundida e aceita para fins de quantificação da contribuição da FBN para as plantas (Peoples *et al.*, 1989). Deve-se considerar que esta técnica também baseia-se na diluição isotópica de ^{15}N , portanto as recomendações mencionadas para a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , na qual se faz necessária a aplicação de ^{15}N -fertilizante, são as mesmas neste caso, com a única diferença de que a marcação do solo se dá de forma natural.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Visando alcançar os objetivos propostos nesta tese foram desenvolvidos os seguintes experimentos:

3.1 Experimento 1. Avaliação da contribuição da FBN em 10 variedades de cana-de-açúcar pelas técnicas de balanço de N total do sistema solo-planta e pela abundância natural de ^{15}N , em condições de campo.

3.1.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental

Este estudo foi realizado no campo experimental da Embrapa - Agrobiologia desde maio de 1989, num Argissolo de textura média, muito pobre em nutrientes, especialmente nitrogênio, cujas características químicas são apresentadas na Tabela 1. O objetivo deste trabalho foi o de realizar um estudo comparativo entre 10 cultivares de cana de açúcar, quanto à acumulação de nitrogênio, produtividade e potencialidade para a fixação biológica de nitrogênio (FBN). As variedades em avaliação (CB 47-89, CB 45-3, SP 70-1143, SP 79-2312, SP 71-1406, SP 71-6163, SP 70-1284, RB 72-454, Krakatau (*Saccharum spontaneum*) e Chunnee (*S. barberi*)) foram selecionadas por sua boa produção em solos pobres e/ou pelo potencial para FBN observado em experimentos anteriores, sendo utilizada a variedade “Chunnee” como “testemunha não fixadora”. Ressalta-se que a variedade RB 72-454 foi incluída entre as variedades avaliadas no momento da renovação do canavial (1999), por ser naquela época, uma das mais plantadas em lavouras comerciais do país, substituindo a variedade NA 56-79 que devido a sua susceptibilidade à doença denominada “carvão” foi retirada desse experimento ainda na 1ª fase. O arranjo experimental foi constituído de dez tratamentos, com quatro repetições. Cada unidade experimental tinha cinco linhas com cinco metros de comprimento, espaçadas de 1,1m, totalizando 40 parcelas, distribuídas no delineamento em blocos ao acaso.

Tabela 1 - Características químicas do solo (0-15cm) em amostragem realizada no início do experimento, antes da adubação e do plantio das variedades.

pH	N	P	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Água	g/kg	mg/dm ³		cmolc/dm ³	
5,4	0,57	4,9	22	1,4	2,2

N - Método semimicro-Kjeldahl (Alves *et al.*, 1994); Al; Ca; Mg; K e P – EMBRAPA-SNLCS (1979).

3.1.2 Adubação de Plantio e Manutenção

No plantio (1989) e na renovação do canavial (1999), aplicou-se no fundo do sulco de cana-de-açúcar 100 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio, 150 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples e 50 kg ha⁻¹ de FTE BR 12, como fonte de nutrientes.

As doses de P, K e micronutriente foram aplicadas anualmente de acordo com a análise de solo, com o intuito de garantir que somente o nitrogênio seria o fator limitante para o desenvolvimento da cultura e desta forma estimar com maior exatidão o potencial da FBN para a cultura estudada.

Durante o período experimental, foram efetuadas capinas mecânicas e/ou químicas, de acordo com a necessidade.

3.1.3 Ciclos

O primeiro ciclo da cultura terminou em 1998, após oito cortes. No ano seguinte (agosto de 1999) começou-se um novo ciclo, tendo-se o cuidado de distribuir os mesmos tratamentos nas mesmas parcelas do primeiro ciclo, para continuar avaliando-os por um período maior. Estes dois períodos de tempo (1989-1998 e 1999-2004) serão considerados neste estudo como ciclo ou fases, visando facilitar a apresentação dos resultados.

3.1.4 Quantificação da Contribuição da Fixação Biológica de Nitrogênio

A quantificação da contribuição da FBN para a cana-de-açúcar na primeira fase do experimento (1989 –1998) foi estimada pela técnica do balanço de N total do sistema solo/planta (Boddey *et al.*, 1987). Esta técnica consiste em quantificar o N-total do solo no início e no final do experimento descontando-se o N-total acumulado e exportado do solo pelas plantas a cada ano por ocasião das colheitas. A interpretação dos resultados é que um balanço positivo significa que estaria havendo uma fonte de entrada de nitrogênio no sistema solo-planta. Com o nível de conhecimento atual e nas condições desse estudo, acredita-se que este ingresso de nitrogênio possa ser atribuído ao processo de fixação biológica de nitrogênio.

$$N_{\text{FBN}} = N_{\text{total}} \text{ final no sistema solo/planta} - N_{\text{total}} \text{ inicial no sistema solo}$$

Onde:

N-total final no sistema solo-planta= N-total no solo na colheita final + N-acumulado e exportado do campo na parte aérea da cana em todas as colheita

N-total inicial no sistema solo= N-total no solo no plantio

Para aplicação desta técnica foi analisado para N-total o solo, nas profundidades de 0-15; 15-30 e 30-45cm, e as diferentes partes das plantas (colmo, palha e bandeira). O solo foi amostrado no início do experimento e no final da primeira fase (1989 e 1998) Nestas ocasiões, com auxílio de anel de Kopeck, foram retiradas amostras de solo para determinação de sua densidade aparente em cada camada. Assim foi possível determinar a massa de solo existente em cada profundidade e, associando-se os valores encontrados ao teor de nitrogênio do solo, determinou-se o estoque deste nutriente em cada camada.

Anualmente, na ocasião da colheita, toda a parte aérea (colmo + palha + bandeira) foi pesada e amostrada para determinação de seu conteúdo de matéria seca. Estas amostras foram posteriormente moídas em moinho de facas “tipo Wiley” e analisadas para N-total. Assim, foi possível quantificar-se a contribuição da FBN para a cultura de cana após 8 anos de cultivo.

Na segunda fase deste estudo, foi aplicada a técnica da abundância natural de ¹⁵N proposta por Shearer e Kohl (1986). Nesta técnica, as plantas de cana-de-açúcar foram amostradas retirando-se a primeira folha completamente desenvolvida, denominada “folha +3”, que é utilizada para determinação do estado nutricional das plantas nesta cultura

(Orlando Filho, 1983) e também pelo fato dessa folha, de acordo com Boddey *et al* (2001), apresentar um valor médio de abundância natural de ^{15}N da planta inteira. Em cada parcela foram coletadas ao acaso 10 folhas. Na área do experimento foram amostradas as plantas não leguminosas de ocorrência natural na lavoura (“plantas invasoras”), para serem utilizadas como plantas testemunhas nesta última técnica. Estas plantas foram identificadas taxonomicamente ao nível de espécie, e o número de espécies amostradas variou em função da ocorrência das mesmas nas parcelas. Em relação ao procedimento de coleta, as plantas invasoras eram identificadas e coletavam-se 3 repetições da parte aérea de cada espécie.

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 testemunhas, sem que a FBN esteja, de fato, contribuindo para o sistema, bastando para isso que as plantas testemunhas empregadas no estudo utilizem N das camadas do solo em proporções diferentes daquelas para cana-de-açúcar.

Para avaliar essa situação, realizou-se um estudo adicional em casa de vegetação para verificar o grau de uniformidade dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ no perfil do solo. Para isso, 4 espécies de plantas não fixadoras (Trapoeiraba - *Commelina bengalensis*, Pé de Galinha – *Elensine indica*, Sorgo – *Sorghum bicolor* e Painço – *Panicum mileaceum*), utilizadas como testemunhas não fixadoras, foram cultivadas em amostras de 7 diferentes profundidades do perfil do solo (0-10; 10-20; 20-30; 30-40; 40-50; 50-60; 60-75). O solo referente a cada profundidade foi coletado em fevereiro de 2005 na área do experimento 1, e após esta etapa o mesmo foi seco e peneirado utilizando uma malha de 2mm. Na tabela 2 pode ser observado o resultado da análise química das diferentes camadas no momento da coleta do solo. Trata-se, como mencionado anteriormente, de um solo pobre em nutrientes, representativo da região, sendo que a disponibilidade de nutrientes é muito baixa, especialmente abaixo de 40 cm de profundidade.

Tabela 2 - Análise química do solo no momento da implantação dos tratamentos referente a este estudo.

Prof.	pH H ₂ O	N g/kg	Al ⁺³	Ca ⁺² cmolc/dm ³	Mg ⁺² cmolc/dm ³	P mg/dm ³	K ⁺ mg/dm ³
0-10	5,3	0,65	0,0	1,0	0,9	7	18
10-20	5,4	0,58	0,0	1,4	0,4	6	29
20-30	5,5	0,63	0,0	1,5	0,4	2	16
30-40	5,5	0,62	0,0	1,4	0,4	3	13
40-50	5,5	0,44	0,0	1,4	0,7	3	15
50-60	5,6	0,50	0,0	1,7	0,8	3	16
60-75	5,8	0,40	0,0	2,2	0,9	3	16

N - Método semimicro-Kjeldahl (Alves *et al.*, 1994); Al; Ca; Mg; K e P – EMBRAPA-SNLCS (1979).

Neste estudo utilizaram-se vasos contendo 1,2 kg de solo, efetuando-se uma adubação básica composta por 50 mg/kg de solo de FTE BR12, 100 mg/kg de solo de P₂O₅ na forma de superfosfato simples, e 100 mg/kg solo de K₂O na forma de sulfato de potássio, sendo estas recomendações utilizadas para todas as profundidades estudadas. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 4 x 7, sendo os fatores 4 espécies de plantas não fixadoras e 7 diferentes profundidades, com três repetições.

Em relação a densidade de plantio utilizada para as diferentes testemunhas, foi utilizada a densidade de 08 sementes por vaso para Pé de Galinha (*Elensine indica*) e Sorgo (*Sorghum bicolor*), enquanto que para Painço (*Panicum mileaceum*) foram utilizadas 12 sementes por vaso, em vista da baixa porcentagem de germinação. Vale ressaltar porém, que uma semana após a emergência das plantas foi feito um desbaste deixando-se 6 plantas por vaso. Para a quarta espécie testemunha, trapoeraba (*Commelina benghalensis*), o plantio foi feito vegetativamente através do plantio de partes da porção apical dessas plantas, de aproximadamente 5 cm, deixando-se 3 plantas por vaso. É importante frisar que a trapoeraba foi retirada da mesma área de onde foi coletado o solo do experimento.

As amostras de todos os ensaios foram moídas em moinhos do tipo Wiley (<40 mesh) e posteriormente passadas em moinho de rolagem para diminuição da granulometria das amostras (<40 mesh) (Smith e Myung, 1990). Após este processamento as mesmas foram analisadas para a determinação da abundância natural de ¹⁵N utilizando um espectrômetro de relação de massa isotópica de fluxo contínuo (espectrômetro de massa Finnigan DeltaPlus acoplado a um auto-analisador de C e N total Carlo Erba EA 1108 – Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

Em relação ao cálculo da contribuição percentual da FBN para a nutrição nitrogenada das plantas de cana-de-açúcar à nível de campo, este foi realizado aplicando-se a fórmula (Shearer e Kohl, 1986):

$$\%Ndfa = \left(\frac{\delta^{15}N \text{ planta testemunha} - \delta^{15}N \text{ planta teste}}{\delta^{15}N \text{ planta testemunha} - B} \right) \times 100$$

Sendo:

%Ndfa = Contribuição percentual estimada da FBN para as plantas de cana-de-açúcar;

$\delta^{15}N$ da planta testemunha – valor de $\delta^{15}N$ do N disponível solo obtido através de plantas não fixadoras, utilizadas como referência;

$\delta^{15}N$ da planta teste – valor de $\delta^{15}N$ da planta fixadora de N₂ (variedades de cana-de-açúcar);

B – valor da discriminação isotópica de ¹⁵N feita pelas plantas de cana durante o processo de FBN (neste estudo, foi considerado igual a zero (0) (Boddey *et al.*, 2001).

Buscando avaliar ainda mais a FBN, no final da 2ª fase foi feito um balanço de nitrogênio no sistema solo-planta após 13 cortes. Esse balanço foi feito, comparando-se por diferença o conteúdo de N contido no solo até a profundidade de 45 e 60 cm no início (1989) e no final do experimento (2004), somado ao que a planta extraiu (exportação) em todas as colheitas (1ª e 2ª fase). No final do experimento também foram retiradas amostras de solo, com auxílio de anel de Kopeck, para determinação de sua densidade aparente em cada camada. Assim foi possível determinar a massa de solo existente em cada profundidade e, associando-se os valores encontrados ao teor de nitrogênio do solo, determinou-se o estoque deste nutriente em cada camada.

3.1.5 Colheitas, Produção de Biomassa e Acúmulo de N-total

A primeira colheita do canavial (cana planta) foi realizada em outubro de 1990 (Primeira fase) e janeiro de 2001 (Segunda fase) aos 18 meses após o plantio da lavoura, respectivamente. A partir destas datas as mesmas passaram a ser feitas a cada 12 meses para ambas as fases. Em todas as colheitas, a parte aérea das plantas de cana-de-açúcar foi separada em palha, bandeira e colmo. Estimou-se a produtividade da lavoura (rendimento de

colmos frescos), biomassa fresca das folhas verdes (bandeira) e da palhada, pesando-se o material produzido nas três linhas de cultivo centrais de cada parcela (área útil). Em seguida foram retiradas amostras para determinação da matéria seca e N-total em cada parte, sendo o nitrogênio analisado pelo método de Kjeldahl (Alves *et al.*, 1994).

3.1.6 Procedimentos estatísticos

Os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do pacote estatístico MSTAT-C, da Universidade de Michigan, USA e, constaram da análise de variância com a aplicação do teste F para as variáveis rendimento de colmos, produção de matéria seca e nitrogênio total acumulado na parte aérea, e balanço do nitrogênio no sistema solo-planta. Para as variáveis cujo teste F foi significativo, compararam-se as médias dos tratamentos pelo teste de Tukey ($p=0,05$). Esse procedimento também foi utilizado para o Experimento 3. Em relação ao experimento 2, a única diferença foi o teste de média aplicado, que foi o LSD ($p=0,05$), em função desse ter sido o teste utilizado nos dois primeiros anos de avaliação, e optou-se por mantê-los.

No caso da contribuição da FBN, os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas de cana-de-açúcar e das “plantas testemunhas” foram comparados pelo teste de “t-student” e somente as médias que apresentavam diferenças significativas entre si foram utilizadas para o cálculo da contribuição da FBN.

3.2 EXPERIMENTO 2. Avaliação da contribuição da FBN em 9 variedades de cana-de-açúcar pela técnica de abundância natural de ^{15}N , em condições de campo.

3.2.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental.

Este estudo foi realizado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia de junho de 2000 até dezembro de 2004, num Planossolo série Ecologia, textura arenosa, extremamente pobre em nutrientes, especialmente nitrogênio, cujas características químicas são apresentadas na Tabela 3. Os tratamentos consistiram no cultivo de sete variedades comerciais e duas não comerciais de cana-de-açúcar, sendo estas, respectivamente: RB 73-9735; SP 79-2312; RB 72-454; RB 75-8540; RB 83-5089; RB 82-5336; SP 70-1143; Krakatau (*S. spontaneum*) e Chunnee (*Saccharum barberi*). Cada unidade experimental foi constituída de 3 linhas, com 10 m de comprimento, espaçadas de 1,2 m, com três repetições, totalizando 27 parcelas. As cultivares comerciais, que foram avaliadas neste experimento, vêm tendo grande destaque na região canavieira de Campos dos Goytacazes, Norte do Estado do Rio de Janeiro, substituindo cultivares que foram utilizadas por muito tempo na região, como CB 45-3 e SP 70-1143. Até então, poucas informações tinham sido geradas sobre o potencial dessas novas variedades em obter parte do nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento através da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Tabela 3 - Características químicas do solo (0-15cm) em amostragem realizada no início do experimento, antes da adubação e do plantio das variedades de cana-de-açúcar.

pH Água	N %	P mg/dm ³	K ⁺	Ca ²⁺ cmolc/dm ³	Mg ²⁺
6,3	0,051	33	13	1,7	1,3

N - Método semimicro-Kjeldahl (Alves *et al.*, 1994); Ca; Mg; K e P – EMBRAPA-SNLCS (1979).

3.2.2 Adubação de Plantio e Manutenção

No plantio, aplicou-se, no fundo do sulco de plantio da cana-de-açúcar, 120 kg ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio, 150 kg ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato simples e 50 kg ha⁻¹ de FTE BR 12, como fonte de micronutrientes.

Adubações com P, K e micronutrientes foram feitas anualmente, de acordo com a análise de solo, com o intuito de garantir que somente o nitrogênio do solo seria o fator limitante para o desenvolvimento da cultura.

Durante o período experimental, foram efetuadas capinas mecânicas e/ou químicas, de acordo com a necessidade.

3.2.3 Colheitas, produção de biomassa e acúmulo de N-total

A primeira colheita do canavial (cana planta) foi realizada após 18 meses, em dezembro de 2001, e a partir desta, as mesmas passaram a ser feitas a cada 12 meses. Em todas as colheitas, estimou-se a produtividade da lavoura (rendimento de colmos frescos), biomassa fresca das folhas verdes (bandeira) e da palhada pesando-se o material produzido na linha central de cada parcela (área útil). Deste material coletaram-se amostras para determinar conteúdo de matéria seca e N- total.

3.2.4 Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio

A contribuição da FBN para a cana-de-açúcar foi estimada pela técnica da abundância natural de ¹⁵N, proposta por Shearer e Kohl (1986), conforme descrito no 1º experimento.

Na área do experimento foram amostradas as plantas não leguminosas de ocorrência natural na lavoura (“plantas invasoras”), para serem utilizadas como plantas testemunhas nesta última técnica. Estas plantas foram identificadas taxonomicamente ao nível de espécie, e o número de espécie amostrada variou em função da ocorrência das mesmas nas parcelas. Em relação ao procedimento de coleta, coletavam-se 3 repetições da parte aérea de cada espécie.

3.3 EXPERIMENTO 3. Avaliação da potencialidade de 10 genótipos de cana de açúcar para FBN, pelo método de diluição isotópica de ¹⁵N, num Argissolo Vermelho Amarelo.

3.3.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi conduzido na Embrapa Agrobiologia, de setembro de 1996 a abril de 2005, num tanque de concreto medindo 20,0 x 6,0 x 0,6 m, preenchido com aproximadamente 120 Mg de um horizonte B de um Argissolo Vermelho Amarelo, série Itaguaí, proveniente de Piraí, RJ. Assim como no experimento 1, esse estudo também teve

duas fases ou ciclos, uma primeira fase (1996 a 2001) que foi realizada por outros estudantes, sendo muito importante, uma vez que os dados recuperados desta fase, valendo destacar o nitrogênio acumulado na parte aérea e também o N contido no solo inicialmente (1996), tornaram possível fazermos um balanço de nitrogênio no sistema solo-planta após a segunda fase (2001 a 2005), que compreende o período que será focado por essa tese.

Ainda que a primeira fase não seja o objetivo desse estudo, algumas informações referente a mesma são necessárias para entender como foi desenvolvido o experimento e quais as mudanças que ocorreram de uma fase para a outra. Na primeira fase, as variedades de cana-de-açúcar utilizadas foram: Chunnee (*Saccharum barberi*) (testemunha), Krakatau (*Saccharum spontaneum*), e as comerciais híbridas de *Saccharum officinarum* SP 79-1011, SP 70-1143, RB 72-454, SP 71-1406, RB 73-9359, CB 45-3, RB 73-9735 e SP 71-6163, que foram pré-selecionadas por sua boa produção em solos pobres e/ou pela sua eficiência (Krakatau) ou não (Chunnee) para FBN, observada em experimentos anteriores. Nesse período, a quantificação da contribuição da FBN foi realizada pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N , e para aplicação da mesma, o solo usado para preenchimento do tanque de concreto foi marcado com ^{15}N , procedimento já utilizado em estudos anteriores, conforme descrito por Urquiaga *et al* (1992). Para o sucesso da metodologia de diluição isotópica de ^{15}N , há a necessidade de se obter marcação estável ao longo do tempo e em profundidade, para que as plantas testemunha e “fixadora” absorvam nitrogênio do solo com o mesmo enriquecimento em ^{15}N . A técnica baseia-se no fato de que as plantas que não possuem um sistema fixador de N_2 atmosférico associado, vão ter um enriquecimento em ^{15}N semelhante ao do N-disponível do solo. Por outro lado, as plantas que, além do N proveniente do solo, também absorvam N originado da FBN (não marcado), sofrerão uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N e, desta forma, quanto maior a diluição isotópica de ^{15}N maior será a contribuição da FBN (Oliveira, 1994).

Com o objetivo de homogeneizar o solo e a marcação com ^{15}N em todo o tanque, para continuar avaliando a contribuição da FBN por um período ainda maior, em novembro de 2001, este experimento foi renovado, iniciando-se uma segunda fase, em que os resultados serão apresentados nessa tese. Para isso, o solo foi retirado separadamente, homogeneizado, e em seguida devolvido para o tanque de concreto. Outro fato relevante da renovação foi a substituição de algumas variedades por outras mais novas, visando com isso avaliar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio associada às variedades atualmente cultivadas nas lavouras comerciais do País. As novas variedades plantadas foram SP 79-2312, RB 75-8540, RB 83-5089 e RB 82-5336, no lugar antes ocupado pelas variedades SP 79-1011, SP 71-1406, RB 73-9359 e CB 45-3, respectivamente. Algumas variedades como Krakatau, SP 71-6163, RB 72 – 454, SP 70 – 1143 e RB 73 9735 foram mantidas devido a sua alta produção em solos pobres e/ou pelo potencial para FBN observado em experimentos anteriores, incluindo-se a variedade Chunnee, como testemunha por sua baixa eficiência para FBN. Antes da homogeneização do solo foi realizada uma análise química, onde, pode-se observar sua baixa fertilidade atual (Tabela 4). Baseado nisso foi feita a seguinte recomendação de adubação: 320 kg ha^{-1} de P_2O_5 na forma de superfosfato simples, 400 kg ha^{-1} de K_2O na forma de cloreto de potássio, 100 kg ha^{-1} de FTE-BR12 e 250 kg ha^{-1} de escória de siderurgia, sendo que essa adubação foi dividida nas quatro camadas de 15 cm de todo o solo do tanque e misturada uniformemente com enxada rotativa, camada a camada até completar os 60 cm de solo.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições. As unidades experimentais foram constituídas por uma linha de 3,0 m de comprimento, espaçadas de 1,0 m.

Tabela 4 - Resultado da análise de fertilidade do solo no início do experimento

Profundidade	pH em água	N	Al	Ca	Mg	P	K
				cmol _c dm ⁻³		mg dm ⁻³	
0-20 cm	5,1	0,084	0,0	2,5	1,0	6	27

N - Método semimicro-Kjeldahl (Alves *et al.*, 1994); pH_{H₂O}; Al⁺³; Ca⁺²; Mg⁺²; K⁺; P (EMBRAPA, 1979).

3.3.2 Colheitas, produção de biomassa e acúmulo de N-total

A primeira colheita do canavial (cana planta), referente à segunda fase, foi realizada em abril de 2003 aos 18 meses após o plantio. A partir desta data as mesmas passaram a ser feitas a cada 12 meses. Em todas as colheitas a parte aérea das plantas de cana-de-açúcar foi separada em palha, bandeira e colmo. Estimou-se a produtividade da lavoura (rendimento de colmos frescos), biomassa fresca das folhas verdes (bandeira) e da palhada, pesando-se o material produzido na parcela inteira. Deste material coletaram-se amostras para determinar o conteúdo de matéria seca e N- total na parte aérea das plantas avaliadas.

3.3.3 Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio

A metodologia utilizada na segunda fase desse estudo, para a quantificação da FBN, foi a da diluição isotópica de ¹⁵N (Oliveira, 1994). Para aplicação dessa técnica, as plantas de cana-de-açúcar foram amostradas retirando-se a primeira folha completamente desenvolvida, denominada “folha +3”, folha índice do estado nutricional das plantas nesta cultura (Orlando Filho, 1983) e também a que apresenta o valor médio de enriquecimento de ¹⁵N da planta inteira (Boddey *et al.*, 2001). Em cada parcela foram coletadas 8 folhas inteiras no momento de cada colheita. Na área do experimento foram amostradas as plantas de ocorrência natural na lavoura (“plantas invasoras”), para serem utilizadas como plantas testemunhas. Estas plantas foram identificadas taxonomicamente em nível de espécie, e o número de espécies amostradas variou em função da ocorrência das mesmas.

Para se ter maior seguridade nas estimativas da FBN na cultura de cana, também foi realizado um estudo adicional em casa de vegetação para verificar o grau de uniformidade dos valores de enriquecimento de ¹⁵N no perfil do solo.

Para isso, 3 espécies de plantas não fixadoras (trapoeraba - *Commelina bengalensis*, Pé de Galinha – *Elensine indica* e sorgo – *Sorghun bicolor*) utilizadas como testemunhas não fixadoras, foram cultivadas em amostras de 6 diferentes camadas do perfil (0-10; 10-20; 20-30; 30-40; 40-50; 50-60). O solo referente a cada profundidade foi coletado em novembro de 2005 na área do experimento 3, e após esta etapa o mesmo foi seco e peneirado utilizando uma malha de 2 mm. Na tabela 5 pode ser observado o resultado da análise química das diferentes camadas no momento da coleta do solo.

Tabela 5 - Análise química do solo no momento da implantação dos tratamentos referente a este estudo.

Profundidade	pH H ₂ O	Al	Ca cmolc/dm ³	Mg	P mg/dm ³	K	N %
0-10	6	0	2,1	0,9	12	19	0,077
10-20	6,2	0	2,6	0,6	11	13	0,057
20-30	6,1	0	2,4	0,5	8	15	0,069
30-40	6,2	0	2,6	0,5	13	13	0,062
40-50	6,2	0	2,6	0,7	9	9	0,066
50-60	6,9	0	4	0,3	12	11	0,067

N - Método semimicro-Kjeldahl (Alves *et al.*, 1994); pH_{H2O}; Al⁺³; Ca⁺²; Mg⁺²; K⁺; P - EMBRAPA-SNLCS (1979)

Neste estudo utilizaram-se vasos contendo 0,8 kg de terra, efetuando-se a adubação básica 50 mg FTE-BR12/ kg de solo, 80 mg superfosfato simples / kg de solo e 150 mg K₂SO₄ /kg de solo, valendo ressaltar ainda que não foi aplicado N-fertilizante. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, em um esquema fatorial 3 x 6, sendo os fatores 3 espécies de plantas não fixadoras e 6 diferentes profundidades, com três repetições.

Em relação ao plantio das testemunhas, as sementes foram pré-germinadas em vermiculita e posteriormente utilizadas no plantio do experimento deixando-se duas e três plantas por vaso respectivamente para o sorgo e pé de galinha. Já em relação a trapoeraba, foi utilizado o mesmo procedimento descrito no experimento 1, ficando 3 plantas por vaso. Vale ressaltar que os propágulos de trapoeraba que foram transplantados foram retirados na mesma área de onde foi coletado o solo do experimento.

A colheita desse experimento foi realizada na primeira semana de fevereiro de 2006 (76 dias após o plantio). Em relação aos procedimentos adotados no momento da colheita, as plantas de trapoeraba, pé de galinha e sorgo foram separadas em parte aérea e raízes, e levadas à estufa de secagem a 65°C até estabilização de seus pesos.

As amostras de todos os ensaios foram moídas em moinhos do tipo Wiley (<40 mesh) e posteriormente passadas em moinho de rolagem para diminuição da granulometria das amostras (<40 mesh) (Smith e Myung, 1990). Após este processamento as mesmas foram analisadas para a determinação de N-total e posterior quantificação dos átomos de ¹⁵N em excesso utilizando um espectrômetro de relação de massa isotópica de fluxo contínuo (espectrômetro de massa Finnigan DeltaPlus acoplado a um auto-analisador de C e N total Carlo Erba EA 1108 – Finnigan MAT, Bremen, Alemanha).

O cálculo da contribuição percentual da FBN para a nutrição nitrogenada das plantas de cana-de-açúcar foi realizado aplicando-se a fórmula:

$$\%Ndfa = \left[1 - \left(\frac{\text{átomos \% de } ^{15}\text{N em excesso na planta teste}}{\text{átomos \% de } ^{15}\text{N em excesso na planta testemunha}} \right) \right] \times 100$$

Sendo:

%Ndfa = Contribuição percentual da FBN para as plantas de cana-de-açúcar;

átomos % de ¹⁵N em excesso = átomos % de ¹⁵N total – 0,3663

Planta teste = diferentes variedades de cana-de-açúcar

Planta testemunha = plantas invasoras de ocorrência natural

Com o intuito de confirmar os resultados de contribuição da FBN obtidos com a técnica de diluição isotópica de ^{15}N foi avaliada também neste experimento a contribuição da FBN pela técnica de balanço de N total do sistema solo/planta (Boddey *et al.*, 1987). Onde, comparou-se, por diferença, o conteúdo de N contido no solo até a profundidade de 20 cm no início da primeira fase deste experimento (1996) e no final da segunda fase (abril de 2005), somado ao que a planta extraiu (exportação) em todas as colheitas (1^a e 2^a fase).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1

1ª Fase (1989-1998)

Produção de colmos Frescos

Os dados de rendimento de colmos desses 8 anos de cultivo indicam que as variedades comerciais em estudo mantiveram níveis adequados de produtividade sem nenhuma aplicação de N-fertilizante (Tabela 6). No caso das variedades Krakatau e Chunnee, os baixos rendimentos de colmos são esperados, pois estas variedades não são comerciais, apenas usadas no melhoramento genético. Assim observa-se, que a variedade Chunnee manteve níveis baixos de rendimentos de colmos, enquanto as outras variedades, principalmente a SP 70-1143 mostrou, em alguns anos, rendimento acima da média nacional em um solo extremamente pobre em N disponível, o que pode estar confirmando a alta potencialidade para a FBN, como demonstrado por Urquiaga *et al.* (1992).

Os resultados desse estudo indicam a alta eficiência de rendimento que apresenta essa cultura, que crescendo em solo muito pobre pode apresentar alta produtividade, ainda quando não se aplica N fertilizante em nenhum ano. A característica de rendimento na cultura esteve associada ao efeito varietal, sendo que na colheita de 1998 (8º ciclo), as variedades CB 45-3, Krakatau e SP 70-1143, mantiveram rendimentos similares aos do primeiro ciclo.

Tabela 6 - Produtividade de colmos frescos de 9 variedades de cana-de-açúcar (1990-1998).

Variedades de Cana	Rendimento de colmos (Mg ha ⁻¹)								
	1990	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	Média
CB 47-89	72,3ab	48,2a	55,2ab	56,2a	67,9ab	52,5ab	51,0ab	65,5ab	58,6 ab
CB 45-3	74,8ab	38,6ab	55,1ab	57,7a	78,9ab	64,5ab	62,3a	80,0 a	63,9 ab
SP 70-1143	82,8a	41,0ab	106,0a	71,8a	97,9a	72,6a	61,3a	85,0 a	77,3 a
SP 79-2312	102,7a	28,6 c	68,7ab	72,7a	79,0ab	53,3ab	44,8ab	59,5ab	63,6 ab
SP 71-1406	99,0a	48,6a	55,8ab	46,5a	65,3bc	48,3 b	44,4ab	49,8bc	57,2 ab
SP 71-6163	80,4a	49,2a	58,6ab	45,4a	70,5ab	47,6 b	42,3b	63,7ab	57,2 ab
SP 70-1284	87,8a	43,4ab	54,0ab	48,9a	67,3ab	46,9 b	42,5b	66,2ab	57,1 ab
KRAKATAU	39,6bc	30,5ab	52,1ab	47,1a	49,3 bc	46,2 b	45,8ab	58,5ab	46,1 bc
CHUNNEE	32,7c	50,4a	23,8 b	23,0a	23,3 c	17,0 c	19,3c	28,2 c	27,2 c
CV (%)	21	13	19	39	18	23	30	23	20
Precipitação(mm)	989,6	1372	1284,2	1111,8	1362,2	1879,1	1186,8	1317,6	

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

N-Total acumulado na parte aérea

No que diz respeito ao total de N acumulado pela parte aérea nas 8 colheitas (Tabela 7), confirmam-se os resultados anteriores (Reis Júnior 1998; 2000), onde as cultivares SP 70-1143 e Krakatau acumularam grande quantidade de N. As variedades SP 70-1143 e Krakatau acumularam e exportaram do sistema mais de 1000 kg ha⁻¹ de N, em 8 cortes.

Tabela 7 - N-total acumulado pela parte aérea, em variedades de cana-de-açúcar (1990-1998).

Variedades de Cana	N-total da planta(kg ha ⁻¹)								
	1990	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	Total
CB 47-89	126,3a	99,9a	122,2a	91,9abc	97,4abc	82,3abc	73,7abc	106,4 bc	800,1 b
CB 45-3	109,8a	82,3a	133,5a	90,8abc	91,3 bc	107,0ab	77,8abc	103,0 bc	795,5 b
SP 70-1143	120,9a	86,5a	221,6a	144,9a	123,9ab	112,2a	98,4ab	137,2 ab	1045,6a
SP 79-2312	136,2a	80,8a	132,7a	85,1abc	85,6c	79,7abc	54,3c	92,2 bc	746,6 bc
SP 71-1406	130,1a	89,7a	130,0a	62,2bc	96,9abc	74,6abc	63,9bc	85,4 c	732,8 bc
SP 71-6163	116,1a	108,4a	171,1a	88,1abc	106,2abc	86,4abc	74,3abc	111,1 bc	861,7 b
SP 70-1284	136,7a	78,6a	165,7a	86,8abc	105,7abc	72,3bc	77,8abc	107,5 bc	831,1 b
KRAKATAU	108,7a	108,6a	192,5a	125,0ab	129,5a	105,9ab	115,5a	169,2 a	1054,9 a
CHUNNEE	84,9a	78,3a	112,0a	47,1c	112,5abc	47,1 c	49,9c	80,2 c	612,0 c
CV (%)	20	23	37	30	14	19	23	18	10

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Contribuição da FBN

Associando-se então o N-total acumulado pela parte aérea e o N-total contido no solo no início (1989) e no final da primeira fase (1998), foi possível fazer o balanço de N-total no sistema solo-planta.

Considerando-se toda a profundidade de solo avaliada (0-45cm), nota-se que as variedades SP 70-1143, Krakatau, SP 71-6163 e SP 79-2312 apresentaram os maiores balanços de N, mostrando diferença significativa em relação as variedades SP 70-1284 e Chunnee (Tabela 8), que apresentaram um balanço negativo. Esses resultados confirmam o potencial para FBN de algumas variedades como SP 70-1143 e Krakatau, concordando com os trabalhos de outros autores que afirmam que a fixação biológica de nitrogênio é responsável por boa parte da necessidade nitrogenada da cultura de cana (Döbereiner, 1960, Lima *et al.*, 1987, Urquiaga *et al.*, 1992, Yoneyama, 1999, Resende, 2000, Polidoro, 2001; Resende, 2002; Xavier, 2002). Este fato fica bem claro quando observamos que após 8 anos de cultivo, sem nenhuma aplicação de N-fertilizante, para a maioria das variedades não ocorreu uma redução dos níveis de nitrogênio do solo, e principalmente levando em consideração que a cultura apresenta alta extração de nitrogênio.

Tabela 8 - Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em 9 variedades de cana-de-açúcar estimado pelo balanço de N total no sistema solo-planta na profundidade de 0-45cm. Ciclo de 1989- 1998.

Cultivares de cana	Solo		Planta	Balanço de N 0-45cm*
	Inicial	Final	N-Total Parte aérea	
kg de N ha ⁻¹				
CB 47-89	4006 a	3637 a	800 b	431 ab* ¹
CB45-3	4398 a	3691 a	795 b	88 bc
SP 70-1143	4194 a	3722 a	1063 a	591 a
SP 79-2312	4038 a	3654 a	746 bc	362 ab
SP 71-1406	4196 a	3503 a	733 bc	40 bc
SP 71-6163	3545 a	3140 a	860 b	455 ab
SP 70-1284	4090 a	3105 a	831 b	-154 c
KRAKATAU	4306 a	3702 a	1054 a	450 ab
CHUNNEE	4078 a	3306 a	612 c	-160 c
CV	11	9	10	6

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de tukey ($p=0,05$).

*Balanço de N-total do sistema = (N final do solo + N acumulado pela planta em 8 colheitas) – N inicial do solo.

*¹ Os dados foram transformados usando a função LN (X + 682).

2ª Fase (1999-2004)

Produção de colmos frescos

Os resultados que serão apresentados a seguir, referem-se a segunda fase do estudo, a qual iniciou-se no ano agrícola de 1999, possibilitando a avaliação de cinco colheitas da cana-de-açúcar.

Os dados de rendimento de colmos dos cinco últimos anos de cultivo após a renovação, demonstram que a variedade Chunnee novamente manteve os mais baixos níveis de rendimento de colmos, enquanto que algumas variedades comerciais mantiveram até o quarto corte, altos níveis de produtividade, sem nenhuma aplicação de N-fertilizante (Tabela 9). Dentre estas, pode-se destacar as variedades comerciais RB 72-454, SP 79-2312 e SP 70-1143 que nos três primeiros anos de avaliação após a renovação mostraram uma tendência de apresentar os maiores rendimentos de colmos. Essa posição de destaque é confirmada quando considera-se a média dos cinco anos de avaliação, valendo ressaltar, porém, que não foi observada diferença significativa em relação as variedades comerciais. As altas produções observadas para as variedades SP 70-1143 e SP 79-2312 podem estar confirmando a alta potencialidade das mesmas para FBN constatada na primeira fase desse estudo. Em relação a variedade RB 72-454, estes dados confirmam uma característica dessa variedade, que é a capacidade de apresentar altas produções tanto em cana-planta como nas socarias, além de ser uma variedade pouco exigente em termos de fertilidade do solo (Ridesa, 2005). Em relação a essa variedade, não se deve descartar o potencial para FBN demonstrado em outros trabalhos (Resende, 2000; Polidoro *et al.* 2001; Boddey *et al.*, 2001; Xavier, 2002), o que vêm a corroborar a sua adaptabilidade a solos pobres em N-disponível.

Em relação à penúltima colheita (2003), os maiores destaques foram observados nas variedades SP 70-1143, CB 47-89, SP 70-1284 e SP 79-2312 (Tabela 9), porém a diferença só foi significativa em relação a variedade Chunnee. Neste ano, foi observado que os rendimentos de colmos para todas as variedades, com exceção da CB 45-3 e RB 72-454,

foram superiores aos encontrados no ano anterior. Este fato geralmente não acontece com a cultura da cana-de-açúcar, em que sempre se espera uma redução do rendimento de um ano para o outro. A explicação para este fato deve-se a precipitação observada nesse ano agrícola que, segundo os dados da PESAGRO-RIO demonstrou para o ano de 2002 uma precipitação de 1001 mm, enquanto que no ano de 2003 a precipitação foi de 1402 mm. Dessa forma, a influência positiva da precipitação prevaleceu em relação à idade do canavial, fato este que já foi observado por Gomes (2003).

Na colheita da 4ª soca (2004) as variedades que mais se destacaram em relação a produção de colmos foram Krakatau, seguida pelas variedades SP 71-6163 e SP 70-1143. Em relação a essas três variedades, não foi observada diferença estatística, porém a primeira mostrou diferença significativa em relação às outras variedades comerciais e também em relação a Chunnee. Os baixos rendimentos encontrados, eram esperados, sendo explicados pelo fato desse ter sido o quinto corte. É por este motivo que na maioria das regiões produtoras de cana-de-açúcar, após o quarto ou quinto corte, se faz a renovação do canavial.

Tabela 9 - Produtividade de colmos frescos de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	Rendimento de colmos					
	Ano Agrícola					
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	Média
	Mg ha ⁻¹					
CB 47-89	93,7 b	99,4 a	57,8 a	75,0 a	31,9 b	71,6 a
CB 45-3	89,8 bc	81,2 ab	69,6 a	62,5 a	28,0 b	66,2 a
RB 72 – 454	133,7 a	103,2 a	75,5 a	67,1 a	25,8 b	81,1 a
SP 70-1143	117,6 ab	105,6 a	79,0 a	84,8 a	35,0 ab	84,4 a
SP 79-2312	107,6 ab	112,1 a	60,2 a	70,0 a	28,7 b	75,7 a
SP 71-1406	94,9 b	77,2 ab	57,1 a	61,1 ab	25,5 b	63,2 a
SP 71-6163	108,8 ab	93,4 a	54,9 a	61,9 ab	37,9 ab	71,4 a
SP 70-1284	97,9 b	75,6 ab	46,4 ab	72,9 a	26,8 b	63,9 a
KRAKATAU	60,4 cd	69,9ab	57,9 a	63,3 a	47,0 a	59,7 a
CHUNNEE	29,8d	25,8 b	17,8 b	28,9 b	7,1 c	21,9 b
CV (%)	13	28	25	20	18	14
Precipitação (mm)	1445,3	940,4	1001,4	1402,5	1221,9	

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Produção de matéria seca da parte aérea da cana-de-açúcar

Considerando-se a matéria seca da parte aérea da cana-de-açúcar como um todo (colmo + palha + bandeira), destaca-se que os valores totais das 5 colheitas (2ª fase) oscilaram entre 93 e 269 Mg (Tabela 10) para as diferentes variedades. Os valores aqui encontrados indicam um acúmulo anual de cerca de 19 a 53 Mg ha⁻¹ de matéria seca. Assim como para produção de colmos, as variedades comerciais que mais se destacaram foram SP 70-1143 e RB 72-454, mostrando diferença significativa em relação a variedade Chunnee. Para este parâmetro, a variedade Krakatau foi a que apresentou o maior acúmulo de matéria seca, diferindo significativamente de algumas variedades comerciais.

Estes resultados são melhor observados quando se analisa o desdobramento desta tabela, em colmos, palha e bandeira (Tabelas 11 a 13).

Tabela 10 - Produção de matéria seca total da parte aérea de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	Matéria seca total da Parte aérea					
	Ano Agrícola					
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	Total
	Mg ha ⁻¹					
CB 47-89	48,0 bc	50,8 ab	34,3 abc	42,8 ab	21,8 bc	197,7 ab
CB 45-3	42,2 bc	45,4 ab	39,9 ab	37,8 ab	19,6 bc	184,9 b
RB 72 – 454	88,3 a	58,7 a	39,1 ab	39,6 ab	16,5 bcd	242,2 ab
SP 70-1143	63,3 ab	61,5 a	46,6 ab	51,9 a	23,5 bc	246,8 ab
SP 79-2312	47,7 bc	54,5 a	30,0abc	39,4 ab	16,2 cd	187,8 b
SP 71-1406	45,3 bc	43,8 ab	33,1 abc	37,4 ab	16,3 bcd	175,9 b
SP 71-6163	56,7 abc	52,4 a	38,3 ab	42,8 ab	25,7 b	215,9 ab
SP 70-1284	45,4 bc	42,3 ab	27,1 bc	40,2 ab	16,4 bcd	171,4 bc
KRAKATAU	56,1 abc	63,8 a	50,5 a	52,8 a	46,3 a	269,5 a
CHUNNEE	22,6	23,4 b	14,8 c	23,8 b	8,7 d	93,3 c
CV (%)	31	24	24	23	17	16

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Em relação à matéria seca da palha de cana-de-açúcar, nota-se que esta representou um potencial de adição ao solo de até 81 Mg ha⁻¹ nas 5 colheitas, o que equivale à cerca de 16 Mg ha⁻¹ por colheita, sendo este valor observado para a variedade Krakatau e SP 71-6163 (Tabela 11). Estes valores são representativos e demonstram a importância da palha não somente para a manutenção da umidade do solo, controle de ervas daninhas, mas também para a sua fertilidade e até mesmo para a mitigação das emissões de CO₂ (Resende *et al.*, 2006). Em relação as outras variedades comerciais, houve uma tendência das variedades SP 70-1143 e RB 72-454, mostrarem os maiores acúmulos de matéria seca de palha.

Tabela 11 - Produção de matéria seca da palha de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	Matéria seca da Palha					
	Ano Agrícola					
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	Total
	Mg ha ⁻¹					
CB 47-89	13,9 abc	15,0 a	11,8 ab	11,0 ab	7,4 bc	59,1 abc
CB 45-3	12,2 bc	13,4 a	13,9 ab	12,2 ab	6,5 bc	58,2 abc
RB 72 – 454	22,3 a	19,2 a	14,4 ab	11,6 ab	6,1 c	73,6 ab
SP 70-1143	15,9 abc	19,0 a	15,4 ab	15,9 a	7,2 bc	73,4 ab
SP 79-2312	14,0 abc	14,4 a	10,4 ab	8,5 b	5,0 c	52,3 bc
SP 71-1406	11,2 bc	13,2 a	12,1 ab	10,1 ab	6,6 bc	53,2 abc
SP 71-6163	20,0 ab	19,7 a	17,4 a	14,6 ab	9,9 b	81,6 a
SP 70-1284	13,3 abc	14,2 a	10,0 ab	11,0 ab	6,9 bc	55,4 abc
KRAKATAU	14,7 abc	19,6 a	15,5 ab	15,0 ab	16,4 a	81,2 ab
CHUNNEE	7,7 c	12,2 a	6,9 b	8,6 b	4,1 c	39,5 c
CV(%)	25	39	30	22	19	18

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Pela Tabela 12, pode-se observar o acúmulo de matéria seca de colmo durante a 2ª fase, valendo destacar que os valores totais das 5 colheitas oscilaram entre 41 e 144 Mg para as diferentes variedades. Para este parâmetro não foi observada diferença significativa entre as variedades comerciais e a Krakatau, porém estas mostraram significância estatística em relação a variedade Chunnee.

Tabela 12 - Produção de matéria seca do colmo de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	Matéria seca do colmo					
	Ano Agrícola					Total
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	
	Mg ha ⁻¹					
CB 47-89	28,7 ab	32,6 a	17,4 ab	23,8 ab	9,9 b	112,4 a
CB 45-3	24,6 b	28,0 a	20,8 a	20,0 ab	10,2 b	103,6 a
RB 72 – 454	59,1 a	34,8 a	19,4 a	20,9 ab	7,5 bc	141,7 a
SP 70-1143	39,6 ab	38,6 a	25,2 a	28,2 a	12,8 b	144,4 a
SP 79-2312	30,4 ab	37,1 a	17,0 ab	26,4 ab	9,3 b	120,2 a
SP 71-1406	29,9 ab	27,6 a	17,3 ab	20,9 ab	7,5 bc	103,2 a
SP 71-6163	30,8 ab	29,2 a	16,2 ab	22,4 ab	11,3 b	109,9 a
SP 70-1284	27,5 ab	25,0 ab	13,9 ab	24,9 ab	7,3 bc	98,6 a
KRAKATAU	29,5 ab	34,3 a	23,4 a	23,9 ab	20,5 a	131,6 a
CHUNNEE	11,9 b	9,8 b	5,9 b	11,1 b	2,9 c	41,6 b
CV(%)	46	25	28	28	25	20

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Na tabela 13, pode-se observar o acúmulo de matéria seca da bandeira, valendo destacar que no final das 5 colheitas (2ª fase), os valores totais de acúmulo oscilaram entre 11 e 56 Mg para as diferentes variedades. Novamente a variedade Krakatau mostrou uma posição de destaque, diferindo estatisticamente de todas as variedades estudadas.

Tabela 13 - Produção de matéria seca total da bandeira de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	Matéria seca total da Bandeira					
	Ano Agrícola					Total
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	
	Mg ha ⁻¹					
CB 47-89	5,3 bcde	3,2 b	5,0 bcd	7,8 b	4,4 b	25,7 bc
CB 45-3	5,3 bcde	3,9 b	5,0 bcd	5,4 b	2,8 de	22,4 bcde
RB 72 – 454	6,8 bc	4,5 b	5,2 bc	7,0 b	2,8 cde	26,3 bc
SP 70-1143	7,8 b	3,8 b	5,9 b	7,6 b	3,3 bcd	28,4 b
SP 79-2312	3,2 de	2,9 b	2,4 cd	4,5 b	1,8 e	14,8 ef
SP 71-1406	4,2 cde	2,8 b	3,6 bcd	6,3 b	2,1 de	19,0 cdef
SP 71-6163	5,8 bcd	3,4 b	4,6 bcd	5,7 b	4,3 bc	23,8 bcd
SP 70-1284	4,5 cde	3,0 b	3,1 bncd	4,3 b	2,1 de	17,0 def
KRAKATAU	11,7 a	9,7 a	11,5 a	13,8 a	9,3 a	56,0 a
CHUNNEE	3,0 e	1,3 b	1,9 d	4,0 b	1,7 e	11,9 f
CV(%)	19	41	25	23	26	14

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

N-total acumulado pelas plantas na cultura de cana-de-açúcar

Os elevados níveis de produtividade alcançados pelas variedades supra citadas, sem adubação nitrogenada, resultam também numa elevada demanda de N pelas plantas, as quais acumularam em cinco cortes entre 290 e 842 kg/ha deste nutriente, apenas na parte aérea (Tabela 14). Assim, dentro do manejo adotado, onde nunca foi adicionado N-fertilizante ao solo, atribui-se ao processo de FBN o fornecimento de parte significativa do conteúdo deste nutriente acumulado pelas plantas, fato já observado em estudos anteriores (Urquiaga *et al.*, 1992; Boddey *et al.*, 2001), e confirmados neste estudo.

No que diz respeito ao total de N acumulado pelas plantas na primeira colheita (Tabela 14), a variedade RB 72-454 apresentou o melhor resultado, mostrando inclusive diferença estatística em relação às outras variedades comerciais que já vinham obtendo excelentes resultados. Na colheita da primeira (2001) e segunda socas (2002), as variedades comerciais que obtiveram os maiores acúmulos de N foram respectivamente: SP 71-6163 e SP 70-1143, porém não foi observado diferença estatística em relação às demais. Assim como para a produção de colmos, foi observado também um aumento do nitrogênio acumulado pelas plantas na quarta colheita (2003) em relação à colheita anterior (2002). Este fato pode ser devido a um melhor aproveitamento do nitrogênio do solo, em função do regime hídrico, aliado a maior produtividade. Nesta colheita as variedades comerciais SP 70-1143, CB 47-89, SP 70-1284 e SP 71-6163 apresentaram um maior acúmulo de nitrogênio, porém não significativo em relação às demais. Na última colheita (2004) e na média referente aos cinco anos de avaliação, a variedade que mais se destacou foi a Krakatau, confirmando assim o potencial já observado nas colheitas anteriores onde, para esse parâmetro, essa variedade apresentou diferença significativa em relação às variedades comerciais. Vale ressaltar que o grande acúmulo de nitrogênio observado para esta variedade, já era esperado, uma vez que essa cultivar apresenta-se bastante eficiente para FBN (Urquiaga *et al.*, 1989;1992). Este fato faz com que essa cultivar seja utilizada como “testemunha fixadora de nitrogênio” nesse experimento. Quando considera-se a média de acumulação de nitrogênio durante todo o período de avaliação, vale destacar também as variedades RB 72-454 e SP 71-6163, que mostraram diferença significativa em relação às outras variedades comerciais, com exceção das variedades SP 70-1143 e CB 47-89 e SP 70-1284.

Tabela 14 - Conteúdo de N na parte aérea das plantas em dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total da planta(kg ha ⁻¹)					Total
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	
CB 47-89	133,7 bc	83,5 bc	86,1 bc	149,7 b	65,4 c	518,4 bc
CB 45-3	116,1 bc	74,9 bc	97,0 bc	111,4 bc	51,6 cd	451,0 cd
RB 72 – 454	264,6 a	101,9 ab	92,0 bc	140,9 b	46,3 cd	645,7 b
SP 70-1143	155,7 b	90,3 bc	120,3 ab	155,7 b	71,8 bc	593,9 bc
SP 79-2312	119,6 bc	85,6 bc	80,3 bc	119,2 bc	47,8 cd	452,5 cd
SP 71-1406	116,3 bc	76,9 bc	73,9 bc	123,9 bc	51,0 cd	442,0 cd
SP 71-6163	179,3 b	105,0 ab	103,2 ab	146,6 b	93,1 b	627,2 b
SP 70-1284	144,8 b	69,2 bc	72,5 bc	147,5 b	57,8 cd	491,8 bc
KRAKATAU	184,0 b	151,0 a	158,3 a	201,8 a	146,6 a	841,7 a
CHUNNEE	70,3 c	44,7 c	44,0 c	94,2 c	36,8 d	290,0 d
CV(%)	21	27	25	13	20	12

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, p=0,05.

Assim como para a matéria seca, para o acúmulo de nitrogênio também foi feito o desdobramento nas diferentes partes da planta (palha, bandeira e colmo) que pode ser observado da tabela 15 a 17.

Na palhada constata-se que estes valores foram muito expressivos e situados entre 120 e 232 kg ha⁻¹ durante os 5 cortes referentes a 2ª fase desse experimento. (Tabela 15).

Já em relação a bandeira, durante esse mesmo período, os valores oscilaram entre 80 e 426 kg ha⁻¹ de N dependo da variedade (Tabela 16). Associando-se o N-total contido nessas duas partes das plantas (palha + bandeira), para a variedade RB 72-454 e Krakatau, estes valores estiveram próximos a 384 e 658 kg ha⁻¹ de N, respectivamente, o que seria equivalente, no caso da variedade RB 72-454, a um acúmulo médio nos cinco anos de cerca de 76 kg ha⁻¹ anuais, sem adubação nitrogenada. Este valor é expressivo, principalmente quando se considera que no Brasil, são aplicados em média cerca de 60-80 kg ha⁻¹ ano de N (Resende, 2002). É possível que esses valores, caso não sejam perdidos pela queima, juntamente com a FBN sejam capazes de manter a sustentabilidade nitrogenada nos solos de canaviais e quem sabe, até mesmo eliminar a adubação nitrogenada da cultura.

Considerando-se o N-total acumulado nos colmos (Tabela 17), constata-se que no somatório das 5 colheitas este oscilou entre 89 e 261 kg ha⁻¹ para as diferentes variedades. A grande retirada deste nutriente do sistema indica que existe algum mecanismo de reposição natural de nitrogênio associado a cultura, caso contrário, não seria possível um solo, por mais fértil que fosse, manter sua capacidade produtiva com tamanha extração deste nutriente. Este forte indicativo reforça os resultados obtidos por diversos autores em que a contribuição da fixação biológica de nitrogênio vem sendo descrita como fundamental para a nutrição nitrogenada da cultura e que, dependendo da variedade pode chegar até a 60% do N-total acumulado pela planta (Lima, 1987; Resende, 2000; Polidoro, 2001; Boddey *et al.*, 2002)

Tabela 15 - Conteúdo de N na palha em dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total da palha (kg ha ⁻¹)					Total
	Ano Agrícola					
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	
CB 47-89	49,9 abc	15,0 ab	34,0 a	32,0 cd	22,9 bc	153,8 abc
CB 45-3	47,7 bc	13,4 b	40,9 a	42,3 abcd	20,3 bc	164,6 abc
RB 72 – 454	85,8 a	19,2 ab	30,1 a	41,6 bcd	18,9 c	195,6 abc
SP 70-1143	46,9 bc	19,0 ab	49,7 a	52,0 abc	23,4 bc	191,0 abc
SP 79-2312	44,6 bc	14,4 b	40,4 a	26,1 d	19,5 c	145,0 bc
SP 71-1406	35,6 c	13,2 b	33,6 a	37,7 bcd	23,0 bc	143,1 bc
SP 71-6163	72,1 ab	19,7 ab	46,2 a	47,0 abcd	34,5 ab	219,5 ab
SP 70-1284	55,4 abc	14,2 b	30,1 a	55,8 ab	26,0 bc	181,5 abc
KRAKATAU	46,5 bc	26,6 a	46,4 a	64,5 a	47,7 a	231,7 a
CHUNNEE	30,4 c	12,2 b	23,2 a	38,5 bcd	16,1 c	120,4 c
CV(%)	36	28	38	23	23	18

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, p=0,05.

Tabela 16 - Conteúdo de N na bandeira em dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total da bandeira (kg ha ⁻¹)					
	Ano Agrícola					
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	Total
CB 47-89	33,8 bcd	24,8 b	30,1 bc	82,0 b	30,8 bc	201,5 bc
CB 45-3	30,6 bcd	30,0 b	33,6 bc	41,3 de	19,5 cd	155,0 cde
RB 72 – 454	40,8 bcd	34,9 b	32,9 bc	62,9 c	16,7 d	188,2 bcd
SP 70-1143	50,2 b	29,5 b	39,5 b	61,7 c	28,7 bc	209,6 b
SP 79-2312	20,2 cd	23,0 b	17,1 bc	39,7 de	15,7 d	115,7 ef
SP 71-1406	31,8 bcd	22,2 b	19,4 bc	48,3 cd	16,8 d	138,5 de
SP 71-6163	42,0 bc	26,6 b	32,6 bc	54,7 cd	36,1 b	192,0 bc
SP 70-1284	37,5 bcd	23,6 b	23,9 bc	50,0 cd	20,7 cd	155,7 cde
KRAKATAU	88,5 a	75,2 a	84,1 a	108,8 a	69,7 a	426,3 a
CHUNNEE	17,8 d	10,2 b	11,0 c	29,1 e	11,8 d	79,9 f
CV(%)	23	41	28	13	32	11

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, p=0,05.

Tabela 17 - Conteúdo de N no colmo em dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nas cinco colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total do colmo (kg ha ⁻¹)					
	Ano Agrícola					
	1999/2000	2001	2002	2003	2004	Total
CB 47-89	49,8 b	43,5 ab	21,8 ab	35,6 ab	11,5 bc	162,2 bc
CB 45-3	37,6 b	31,3 ab	22,4 ab	27,7 b	11,6 bc	130,6 bc
RB 72 – 454	137,9 a	47,7 ab	28,9 a	36,3 ab	10,5 c	261,3 a
SP 70-1143	58,5 b	41,7 ab	31,0 a	41,9 ab	19,6 abc	192,7 ab
SP 79-2312	54,6 b	48,0 ab	22,6 ab	53,2 a	12,5 bc	190,9 ab
SP 71-1406	48,7 b	41,3 ab	20,7 ab	37,8 ab	11,0 bc	159,5 bc
SP 71-6163	65,1 b	58,5 a	24,2 ab	44,7 ab	22,4 ab	214,9 ab
SP 70-1284	51,8 b	31,3 ab	18,3 ab	41,5 ab	10,9 bc	153,8 bc
KRAKATAU	48,8 b	49,1 ab	27,7 a	28,5 b	29,1 a	183,2 b
CHUNNEE	21,9 b	22,1 b	9,7b	26,4 b	8,7 c	88,8 c
CV(%)	29	27	27	21	32	20

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey, p=0,05.

Contribuição pela técnica de abundância natural de ¹⁵N

O uso de plantas de ocorrência natural nas lavouras de cana-de-açúcar (plantas invasoras), “plantas testemunha”, para estimar o valor da abundância natural de ¹⁵N disponível no solo, ou seja, o valor de $\delta^{15}\text{N}$ observado em plantas que utilizam apenas o N proveniente do solo, foi avaliado comparando-se os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nestas plantas com aqueles observados nas plantas de cana-de-açúcar. De uma maneira geral, com exceção da colheita de cana-planta onde os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas testemunhas foram maiores do

que os observados na cana-de-açúcar (Tabela 18), em todas as outras colheitas (Tabela 19 a 21), o valor de $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas testemunhas foram iguais ou significativamente maiores que os observados na cana-de-açúcar, possibilitando a aplicação da técnica de $\delta^{15}\text{N}$ para a estimativa da contribuição da FBN para a cana-de-açúcar, como estipulado por Shearer e Kohl, (1986). A estimativa da contribuição da FBN para as plantas de cana-de-açúcar, neste estudo, foi realizada somente quando o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ da espécie de planta testemunha foi significativamente maior que o observado na planta de cana-de-açúcar, avaliados pelo teste de t-student, como proposto por Boddey *et al.* (2001).

Tabela 18 – Valores de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) observado para as diferentes variedade de cana-de-açúcar e para as plantas testemunhas no ciclo de cana-planta. Segunda fase de cultivo.

Variedades cana-de-açúcar	$\delta^{15}\text{N}$(‰)
CB 47-89	6,91 ab
CB 45-3	7,38 a
RB 72-454	6,79 ab
SP 70-1143	6,09 ab
SP 79-2312	6,72 ab
SP 71-1406	5,75 ab
SP 71-6163	6,02 ab
SP 70-1284	5,85 ab
Krakatau	5,01 b
Chunnee	7,36 a

Plantas Testemunhas	$\delta^{15}\text{N}$(‰)
<i>Panicum maximum</i> (Capim Colonião)	6,16
<i>Malva parviflora</i> (Guanxuma)	5,60
<i>Sida cordifolia</i> (Malva Branca)	5,40
<i>Emilia sonchifolia</i> (Pincel)	5,50
Média das testemunhas	5,66

Ao considerarem-se todas as colheitas em que houve avaliação da contribuição da FBN para a cana-de-açúcar, excetuando-se a colheita de cana-planta (valores de $\delta^{15}\text{N}$ na cana-de-açúcar maior que nas plantas testemunhas), observou-se que a contribuição média da FBN variou de 18 a 61% em função da variedade e da época da colheita.

Com relação a contribuição da FBN para 1ª e 2ª soca (Tabela 19), foi observado valores de fixação de até 45 e 53%, respectivamente. Dentre as variedades que mais se destacaram podemos citar as variedades comerciais SP71-1406, SP79-2312 e SP70-1143, e também a variedade Krakatau, valendo ressaltar que as duas últimas confirmaram o potencial para FBN observado na primeira fase desse experimento, concordando com os resultados obtidos por Urquiaga *et al.* (1989; 1992).

Tabela 19 – Contribuição percentual da fixação biológica do nitrogênio (Ndfa) em dez variedades de cana-de-açúcar, estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N (ciclo cana planta, 1ª soca e 2ª soca). Segunda fase de cultivo.

Variedades de Cana-de-açúcar	Contribuição da FBN (%Ndfa)* ¹			
	1ª soca		2ª soca	
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ cana-de-açúcar	%FBN	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ cana-de-açúcar	%FBN
CB 47-89	3,93	30,5**	4,03	NS
CB 45-3	3,81	32,6*	4,18	26,1*
RB 72-454	4,23	25,2**	4,26	24,8*
SP 70-1143	3,12	44,8**	4,09	NS
SP 79-2312	4,44	NS	3,32	41,3**
SP 71-1406	3,97	29,8*	2,62	53,6**
SP 71-6163	4,82	NS	4,12	NS
SP 70-1284	5,07	NS	4,32	NS
Krakatau	3,08	45,4**	2,74	51,6**
Chunnee	3,17	43,9**	4,10	27,5**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da FBN foi utilizado a média (5,66) dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em quatro espécies não fixadoras: *Panicum maximum* - Capim Colônia (6,16‰) ; *Malva parviflora* - guanxuma (5,60‰); *Sida cordifolia* – Malva branca (5,40‰) e *Emilia sonchifolia* - Pincel (5,50‰).

Quando considera-se a contribuição da FBN para 3ª e 4ª soca, os valores variaram entre 18 e 46% e 33 e 61%, respectivamente (Tabela 20 e 21), sendo as maiores contribuições, em termos de variedade comercial, observadas para as variedades SP 71-6163 e SP71-1406.

O fato das variedades de cana-de-açúcar mostrarem valores de contribuição muito diferentes nos diversos anos de avaliação, como é o caso da variedade RB 72-454, demonstra provavelmente a grande influência que os fatores ambientais podem ter sobre a FBN.

Nesse trabalho o potencial das variedades Krakatau e SP 70-1143 para FBN praticamente foi demonstrado em todas as colheitas, com exceção da cana-planta, confirmando os resultados obtidos por outra metodologia (Balanço de nitrogênio no sistema solo-planta) na primeira fase desse experimento e também no trabalho realizado por Urquiaga *et al* (1989; 1992).

A grande surpresa foi os valores de contribuição da FBN observados para a variedade Chunnee a partir da 1ª soca. Esses não eram esperados, uma vez que essa variedade de cana sempre apresentou baixos valores de FBN, sendo tida na maioria dos experimentos, como testemunha “não fixadora”. Este fato talvez possa estar indicando uma adaptação dessa variedade, uma vez que estudos realizados por Reis Júnior (1998; 2000) demonstraram que tanto nas variedades eficientes, como na variedade Chunnee, até então de baixa eficiência para a FBN, a população de diazotróficos endofíticos, tanto qualitativa como quantitativamente, podem ser isolados em proporções similares. O que pode ter acontecido é que o processo de FBN nessa variedade pode ter sido estimulado em função das condições ambientais desfavoráveis (solo e clima), a que ela foi submetida.

Tabela 20 – Contribuição do percentual da fixação biológica de nitrogênio (%FBN) estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), em dez variedades de cana-de-açúcar, ciclo 3^o soca. Segunda fase de cultivo.

Variedades de Cana-de-açúcar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) cana-de-açúcar	Contribuição da FBN (%)* ¹
CB 45-3	4,23	21,6*
CB 47-89	4,80	NS
RB 72-454	4,38	18,6*
SP 70-1143	3,18	40,9*
SP 79-2312	3,69	31,5*
SP 71-1406	3,47	35,4**
SP 71-6163	2,87	46,6**
SP 70-1284	4,17	22,5**
Krakatau	3,32	38,4**
Chunnee	3,55	34,0**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da FBN foi utilizado a média (5,38) dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em quatro espécies não fixadoras: *Malva parviflora* - guanxuma (5,66), *Richardia brasiliensis* - Poaia branca (4,80), *Rhynchelytrum roseum* - Capim favorito (5,53) e *Emilia sonchifolia* - Pincel (5,55).

Tabela 21 – Contribuição do percentual da fixação biológica de nitrogênio (%FBN) estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), em dez variedades de cana-de-açúcar, ciclo 4^o soca. Segunda fase de cultivo.

Variedades de cana-de-açúcar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) Cana-de-açúcar	Contribuição da FBN (%)* ¹
CB 45-3	2,83	42,3**
CB 47-89	2,86	41,6*
RB 72-454	2,79	43,0**
SP 70-1143	2,68	45,4*
SP 79-2312	2,86	41,7**
SP 71-1406	2,26	53,9**
SP 71-6163	3,24	33,9*
SP 70-1284	2,67	45,5*
Krakatau	1,89	61,5**
Chunnee	3,23	34,2*

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da FBN foi utilizado a média (4,96) dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados em três espécies não fixadoras: *Richardia brasiliensis* - Poaia branca (5,19), *Malva parviflora* - Guanxuma (5,44) e *Cyperus ferox* (4,26).

Em relação a quantidade de N fixado durante a 2ª fase desse experimento (Tabela 22) observa-se que a variedade Krakatau assumiu uma posição de destaque em todas as colheitas. Quando considera-se todas as variedades estudadas para as colheitas de 1ª soca, 2ª soca, 3ª soca e 4ª soca, as quantidades de N provenientes da fixação biológica de nitrogênio variaram de 7 a 67 kg ha⁻¹, 11 a 80 kg ha⁻¹, 17 a 76 kg ha⁻¹ e 12 a 91 kg ha⁻¹, respectivamente

Tabela 22 – Quantidade de nitrogênio derivado da fixação biológica de nitrogênio em dez variedades de cana-de-açúcar, nas quatro últimas colheitas da segunda fase.

Variedades de Cana-de-açúcar	N proveniente da FBN kg/ha			
	2001	2002	2003	2004
CB 45-3	22,8 bc	25,0 b	24,6 cd	22,1 bc
CB 47-89	24,8 bc	25,4 b	17,4 d	27,3 bc
RB 72-454	25,9 bc	21,5 b	26,1 cd	19,9 bc
SP 70-1143	42,6 ab	30,5 b	63,9 abc	32,2 b
SP 79-2312	17,9 bc	33,9 b	37,1 abcd	18,7 bc
SP 71-1406	23,5 bc	40,3 b	44,8 abcd	26,2 bc
SP 71-6163	14,9 c	22,5 b	68,8 ab	31,3 b
SP 70-1284	6,9 c	16,6 b	33,3 bcd	26,0 bc
Krakatau	67,2 a	80,7 a	76,7a	91,2 a
Chunnee	19,1 bc	11,5 b	31,4 bcd	12,3 c
CV(%)	42	46	39	34

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p=0,05)

Resultado do experimento em vaso

Com relação aos resultados do experimento em vaso que foi feito com o intuito de observar se existe diferenças na abundância natural do ¹⁵N em profundidade, na Tabela 23 pode-se observar a variação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ para a média ponderada da planta inteira das diferentes testemunhas utilizadas (Trapoeraba, Pé de Galinha, Sorgo e Painço), assim como o $\delta^{15}\text{N}$ da parte aérea e raiz destas plantas.

Quanto aos valores obtidos para a média ponderada da planta inteira, que assume uma importância maior do que os obtidos para a raiz e parte aérea, foi observado que o painço mostrou o menor valor de $\delta^{15}\text{N}$, diferindo estatisticamente do Sorgo e Pé de galinha. Embora existam estas diferenças estatísticas, os valores de variação foram muito baixos, e repercutiriam em diferenças nas estimativas da FBN inferiores a 10%. Assim, pode-se dizer que a abundância natural de ¹⁵N do solo, teve pouca variação e que em geral as espécies empregadas como testemunhas tiveram similar comportamento.

Tabela 23 – Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ para a parte aérea, raiz e média ponderada (raiz e parte aérea) das diferentes testemunhas utilizadas (Trapoeiraba, Pé de Galinha, Sorgo e Painço) crescidas em amostras de diferentes profundidades do solo.

Testemunha	Valores de $\delta^{15}\text{N}$		
	Raiz	Parte aérea	Média Ponderada
Trapoeiraba	7,46 b	7,44 ab	7,49 ab
Pé de galinha	7,81 a	7,64 a	7,75 a
Sorgo	7,23 bc	7,60 ab	7,57 a
Painço	6,98 c	7,27 b	7,05 b
CV(%)	5	6	8

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p=0,05$)

Em relação a variação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes profundidades, que constitui o principal objetivo desse estudo complementar, quando considera-se a média ponderada da planta inteira (Tabela 24), observa-se diferença significativa entre as profundidades de 40-50cm em relação às duas últimas camadas e também em comparação à primeira camada (0-10cm), em que foram observados os menores valores de $\delta^{15}\text{N}$.

Estes resultados corroboram com os resultados obtidos por Ledgard *et al.* (1984) e Piccolo *et al.* (1996), que também evidenciaram menores valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas camadas superficiais do solo, valendo ressaltar que este último trabalhou com diferentes tipos de solo do Brasil. A explicação para este fato pode ser devido a morte das raízes que ocorre de um ano para outro (Faroni, 2004), e também o fato de que as raízes das soqueiras tendem a ser mais superficiais. Dessa forma, a decomposição das raízes de cana-de-açúcar, pode favorecer a entrada de N proveniente da FBN nas camadas superficiais do solo, provocando uma diminuição do valor de $\delta^{15}\text{N}$ dessa camada em relação as outras. De acordo com Ledgard *et al.* (1984) e Piccolo *et al.* (1996), os menores valores de $\delta^{15}\text{N}$ devem ser explicados pela acumulação e transformação de N orgânico que ocorre nas camadas superficiais, concordando assim com os resultados obtidos nesse estudo.

Tabela 24 – Valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes profundidades, considerando os valores médios obtidos pela parte aérea e raiz das diferentes testemunhas utilizadas.

Profundidade	Valores de $\delta^{15}\text{N}$		
	Raiz	Parte aérea	Média Ponderada
0 – 10 cm	6,30 e	5,77 c	6,18 d
10 – 20 cm	7,57 bc	7,91 a	7,80 ab
20 – 30 cm	7,57 bc	8,24 a	7,95 ab
30 – 40 cm	7,84 ab	7,76 ab	7,92 ab
40 – 50 cm	8,21 a	8,16 a	8,04 a
50 – 60 cm	7,13 cd	7,30 b	7,31 bc
60 – 75 cm	6,97 d	7,27 b	7,05 c
CV(%)	5	6	8

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p=0,05$)

Caso fosse observado uma marcação estável, sem diferença de abundância natural do ^{15}N em profundidade, qualquer planta não-fixadora poderia ser utilizada como testemunha, e dessa forma poderíamos confiar plenamente nos dados de contribuição que foram apresentados nas tabelas 19, 20 e 21. Como nesse estudo isto não aconteceu, principalmente se levarmos em consideração os valores de delta ^{15}N da camada superficial (0-10cm), uma vez que para as demais camadas não foi observado diferenças muito grandes, a escolha da testemunha assume uma importância muito grande. Nestas condições, plantas que explorem volumes de solo, diferentemente da cana-de-açúcar, absorverão N em proporções diferentes, levando a estimativas errôneas da FBN (Boddey & Victoria, 1986; Peoples *et al.*, 1989). Como os valores de delta ^{15}N das plantas testemunhas amostradas no campo e utilizadas para o cálculo da FBN durante a segunda fase (Tabela 18, 19 e 20) apresentam valores de $\delta^{15}\text{N}$ muito próximos aos encontrados para a camada de 0- 10 cm, e sabendo que mais de 60 % do sistema radicular da cana-de-açúcar, de acordo com Vasconcelos (1998) se encontra de até 40cm, pode-se deduzir que as testemunhas utilizadas e a cana-de-açúcar estavam explorando volume de solo diferente, e que as estimativas de FBN apresentados anteriormente estariam subestimadas. Desta forma, os valores de FBN mais apropriados para cada uma das variedades, por exemplo para a 3ª e 4ª soca, são apresentados na Tabela 25, onde foi utilizado como valor de $\delta^{15}\text{N}$ da testemunha, o valor de 7,46 que representa a média dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados para as profundidades de 0-75cm.

Com a utilização desse valor de $\delta^{15}\text{N}$, os valores de fixação biológica de nitrogênio que estavam sendo subestimado e variando de 18 e 46% para a 3ª soca, atingiriam valores de FBN de até 61%. Em relação a 4ª soca em que os valores de fixação estavam variando de 33 a 61%, os valores de FBN seriam ainda maiores, e estariam entre 57 e 75% para as diferentes variedades avaliadas.

Tabela 25 – Contribuição do percentual da fixação biológica de nitrogênio (%FBN) estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), em dez variedades de cana-de-açúcar, ciclo 3ª e 4ª soca, utilizando como valor de $\delta^{15}\text{N}$ da testemunha a média ponderada para as diferentes camadas avaliadas (0 a 75cm) . Segunda fase de cultivo.

Variedades de Cana-de-açúcar	2003		2004	
	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ cana-de-açúcar	Contribuição da FBN (%) ^{*1}	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$ cana-de-açúcar	Contribuição da FBN (%) ^{*1}
CB 45-3	4,23	43**	2,83	62**
CB 47-89	4,80	36**	2,86	62**
RB 72-454	4,38	41**	2,79	63**
SP 70-1143	3,18	57**	2,68	64**
SP 79-2312	3,69	51**	2,86	62**
SP 71-1406	3,47	53**	2,26	70**
SP 71-6163	2,87	61**	3,24	57**
SP 70-1284	4,17	44**	2,67	64**
Krakatau	3,32	56**	1,89	75**
Chunnee	3,55	52**	3,23	57**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t

*1 O valor de abundância natural de ^{15}N utilizado para o cálculo da FBN foi 7,46, que representa a média dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados para a média ponderada da planta inteira nas profundidades de 0 a 75cm.

Com o intuito de confirmar a contribuição da FBN obtido pela metodologia de abundância natural de ^{15}N , procurou-se avaliar essa contribuição no final da segunda fase pela metodologia de balanço de nitrogênio no sistema solo-planta nas profundidades de 0-45cm e 0-60cm (Tabelas 26 e 27), onde também foi possível fazer uma comparação com o resultado de balanço obtido no final da primeira fase .

Contribuição da FBN pelo Balanço de nitrogênio no sistema solo-planta

Vale ressaltar que a grande diferença em termos de %FBN, quando compara-se os resultados obtidos pela técnica de abundância natural de ^{15}N utilizando as testemunhas coletadas no campo (tabelas 19, 20 e 21) com os obtidos pelo balanço de nitrogênio no sistema solo-planta (Tabela 26 e 27), foram minimizadas quando utilizou-se o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ das diferentes profundidades (Tabela 25), sendo encontrados para algumas variedades valores de contribuição da FBN bem próximo aos obtidos com o balanço.

Considerando-se o balanço nas profundidades de 0-45 cm (Tabela 26) e 0-60 cm (Tabela 27), nota-se mais uma vez que as variedades Krakatau, SP 71-6163, SP 79-2312 e SP 70-1143, apresentaram os balanços mais positivos, sendo observado diferença significativa destas em relação as variedade CB 45-3 e Chunnee. Dessa forma, esses resultados confirmam o potencial para FBN de algumas variedades como SP 70-1143, Krakatau, SP 79-2312 e SP 71-6163, e também a baixa eficiência da variedade Chunnee, que já tinha sido observado na primeira fase desse experimento, assim como nos resultados obtidos por outros autores (Lima *et al.*, 1987, Urquiaga *et al.*, 1992). Vale ressaltar que as contribuições da FBN obtido com a técnica balanço de nitrogênio no sistema solo-planta, evidenciam a importância do processo de FBN para a sustentabilidade dos níveis de produtividade desta cultura, em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio do solo, e principalmente, levando em consideração que nesse experimento nunca foi adicionado N-fertilizante.

Tabela 26 - Contribuição global da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em 10 variedades de cana-de-açúcar em quinze anos de cultivo (13 cortes), estimado pelo balanço de N total no sistema solo-planta na profundidade de 0-45cm.

Cultivares de cana	Solo		Planta	Balanço de N 0-45cm*	FBN %
	Inicial	Final	N-Total Parte aérea		
kg de N ha ⁻¹					
CB 47-89	4006 a	3181 a	1318 cd	493 ab* ¹	37 a
CB45-3	4398 a	3387 a	1246 cd	235 b	22 ab
SP 70-1143	4194 a	3797 a	1657 ab	1260 a	66 a
SP 79-2312	4038 a	4043 a	1199 d	1204 a	78 a
SP 71-1406	4196 a	3678 a	1175 de	657 ab	55 a
SP 71-6163	3545 a	3328 a	1487 bc	1270 a	80 a
SP 70-1284	4090 a	3366 a	1323 cd	599 ab	44 a
RB 72-454	3332 a	3219 a	843 f	730 ab	66 a
KRAKATAU	4306 a	3875 a	1896 a	1465 a	69 a
CHUNNEE	4078 a	3078 a	901 ef	-99 c	0 b
CV	11	14	9	15	36

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

* Balanço de N-total do sistema = (N final do solo + N acumulado pela planta em 13colheitas) – N inicial do solo.

*1 Os dados foram transformados usando a função LN (X + 332).

Tabela 27 - Contribuição global da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em 10 variedades de cana-de-açúcar em quinze anos de cultivo (13 cortes), estimado pelo balanço de N total no sistema solo-planta na profundidade de 0-60cm.

Cultivares de cana	Solo		Planta	Balanço de N 0-60cm*	FBN %
	Inicial	Final	N-Total Parte aérea		
kg de N ha ⁻¹					
CB 47-89	4925 a	4072 a	1318 cd	465 ab* ¹	35 ab
CB45-3	5522 a	4254 a	1246 cd	-22 b	0 b
SP 70-1143	5374 a	4774 a	1657 ab	1057 ab	55 ab
SP 79-2312	5087 a	5070 a	1199 d	1182 a	72 a
SP 71-1406	5210 a	4675 a	1175 de	640 ab	54 ab
SP 71-6163	4475 a	4188 a	1487 bc	1200 a	75 a
SP 70-1284	4967 a	4251 a	1323 cd	607 ab	45 ab
RB 72-454	4273 a	4005 a	843 f	575 ab	80 a
KRAKATAU	5353 a	4970 a	1896 a	1513 a	67 a
CHUNNEE	4971 a	3852 a	901 ef	-218 c	0 b
CV	12	15	9	17	70

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

*Balanço de N-total do sistema = (N final do solo + N acumulado pela planta em 13 colheitas) – N inicial do solo.

*¹ Os dados foram transformados usando a função LN (X + 566).

Na tabela 28 foi feito um balanço de nitrogênio no solo após 15 anos de cultivo da cana-de-açúcar, o que se observa é que esse balanço foi negativo para todas as variedades que foram avaliadas, mostrando dessa forma que o solo perdeu nitrogênio com o cultivo da cana-de-açúcar, mesmo que a contribuição da FBN associada a cultura foi significativamente alta, mas ainda insuficiente para cobrir toda a demanda de N da cultura. Nessa mesma tabela, estudou-se como ficaria esse balanço se a palha e a bandeira tivessem retornado ao sistema, o que se observa então é que esse balanço, ou ficaria menos negativo, ou até positivo, sendo que os melhores resultados observou-se nas variedades Krakatau, RB 72-454, SP 79-2312 e SP71-6163, em que o potencial para FBN já é bastante conhecido (Lima *et al.*, 1987, Urquiaga *et al.*, 1992, Resende, 2000, Polidoro, 2001). Esses resultados corroboram com os obtidos por Resende (2002), mostrando mais uma vez que a manutenção dos restos culturais (palha e bandeira), é uma boa alternativa de manejo conservacionista.

Tabela 28 – Balanço de nitrogênio no solo após o cultivo de 10 variedades de cana-de-açúcar em quinze anos de cultivo (13 cortes), na profundidade de 0-60cm.

Cultivares de cana	Solo		Diferença	Planta Palha e Bandeira	Balanço de N 0-60cm
	Inicial	Final	Inicial - Final		
	kg de N ha ⁻¹				
CB 47-89	4925 a	4072 a	-853	355	-498
CB45-3	5522 a	4254 a	-1268	319	-949
SP 70-1143	5374 a	4774 a	-600	400	-200
SP 79-2312	5087 a	5070 a	-17	260	243
SP 71-1406	5210 a	4675 a	-535	281	-254
SP 71-6163	4475 a	4188 a	-287	411	124
SP 70-1284	4967 a	4251 a	-716	336	-380
RB 72-454	4273 a	4005 a	-268	383	115
KRAKATAU	5353 a	4970 a	-383	657	274
CHUNNEE	4971 a	3852 a	-1119	200	-919

4.2 Experimento 2

Produção de colmos Frescos

Em relação ao rendimento de colmos em cana-planta, observou-se que algumas variedades obtiveram altos rendimentos, principalmente as variedades RB 75-8540, RB 83-5089, RB 73-9735, SP 79-2312 e RB 82-5336 que demonstraram ser significativamente superiores as variedades Chunnee e Krakatau (Tabela 29).

No segundo ano de avaliação, a variedade RB 75-8540 novamente apresentou uma posição de destaque, mostrando diferença estatística em relação às demais com exceção das variedades RB 72-454 e RB 83-5089. Em termos de características agroindustriais que expliquem tal posição, a variedade RB 75-8540 é caracterizada por apresentar baixa exigência quanto à fertilidade do solo e excelente brotação da soqueira (Ridesa, 2005). Nesse segundo ano, independente da variedade considerada, foram observados valores de produtividade bem menores do que do primeiro ano, sendo este fato explicado pela baixa precipitação pluviométrica no período, além do fato da cana planta permanecer no campo por 18 meses, enquanto que as socarias ficam por somente 12 meses.

Para o terceiro ano de avaliação (2^a soca), os maiores rendimentos foram observados para as variedades comerciais RB 83 – 5089 e RB 72 – 454, mostrando diferença estatística em relação a três variedades comerciais e também para as variedades não comerciais. Valendo destacar que essas duas variedades, assim como a variedade RB 75-8540, apresentam baixa exigência em termos de solos (Ridesa, 2005), e essa parece ser uma característica muito importante quando se trabalha com um solo muito pobre em N-disponível.

Assim como no experimento anterior, foi observado um aumento do rendimento de colmos do ano de 2002 para 2003, mostrando acréscimo de até 22 Mg ha⁻¹, o que novamente pode ser explicado pelo regime hídrico favorável. Esse fato mostra mais uma vez que a água na cultura de cana-de-açúcar assume uma importância tão grande que pode até compensar o decréscimo que seria esperado pelo aumento da idade do canavial, fato este que já foi observado por Gomes (2003).

Em relação à última colheita (3^a soca), a variedade que apresentou a maior produção foi a SP 70-1143, não sendo observado porém, diferença estatística em relação às demais

variedades comerciais, com exceção da RB 75-8540. Quando se considera, a média de rendimento de colmos dos quatro anos de avaliação, as variedades comerciais que mais se destacaram foram RB 83-5089 e RB 75-8540, valendo ressaltar que só foi observada diferença destas em relação à RB 82-5336, Krakatau e Chunnee.

Comparando-se o rendimento de colmos das variedades SP 79-2312, RB 72-454 e SP 70-1143 crescendo no Argissolo (Experimento 1) e no Planossolo (este experimento), observa-se que os resultados foram bastante diferentes, indicando a influência do ambiente, possivelmente um efeito do tipo de solo sobre o desenvolvimento da cultura. Essa amplitude de variação de produtividade das cultivares também foi constatada por Maule *et al.* (2001) e Dias (1997). De acordo com este último autor, em ambiente (solo e clima) mais favorável ao desenvolvimento vegetal, o potencial genético de cada cultivar é mais evidenciado, o que explicaria as diferenças de rendimentos encontrados nos diferentes solos.

Tabela 29 - Produtividade de colmos frescos de 9 variedades de cana de açúcar referentes ao primeiro corte (cana planta), 2º, 3º e 4º cortes (socas), cultivadas num Planossolo, sem adubação nitrogenada.

Variedades de Cana-de-açúcar	Rendimento de colmo (Mg ha ⁻¹)				Média
	2000 – 2001	2002	2003	2004	
RB 73 – 9735	83,8 a	30,5 cd	41,8 bcd	39,4 ab	48,9 ab
SP 79 – 2312	81,3 a	28,1 cde	52,7 abc	50,2 ab	53,1 ab
RB 72 – 454	61,7 ab	41,0 abc	63,7 a	43,7 ab	52,5 ab
RB 75 – 8540	101,2 a	51,8 a	57,1 ab	33,1 bc	60,8 a
RB 83 – 5089	99,1 a	45,6 ab	65,3 a	40,2 ab	62,5 a
RB 82 – 5336	75,1 a	25,1 de	36,2 cd	39,2 ab	43,9 b
SP 70 – 1143	63,6 ab	32,4 bcd	42,3 bcd	63,3 a	50,4 ab
Krakatau	23,7 bc	23,3 de	30,6 d	30,5 bc	27,0 c
Chunnee	14,2 c	13,9 e	25,8 d	13,3 c	16,8 c
Chuva (mm)	1526,2	1001,4	1402,5	1221,9	
CV(%)	37	25	20	36	17

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Produção de matéria seca da parte aérea da cana-de-açúcar

Considerando-se a matéria seca da parte aérea da cana-de-açúcar como um todo (colmo + palha + bandeira), observa-se uma variação, após 4 colheitas, entre 92 e 116 Mg ha⁻¹ (Tabela 30) para as diferentes variedades comerciais. Os valores aqui encontrados indicam um acúmulo anual de cerca de 23 e 29 Mg ha⁻¹ de matéria seca.

Vale destacar que as diferenças entre variedades em relação ao total de matéria seca podem não se traduzir em potencial produtivo, o que é melhor observado quando se analisa o desdobramento desta tabela, em colmos, palha e bandeira (Tabelas 31 a 33).

Tabela 30 - Produção de matéria seca total da parte aérea de nove variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira, segunda e terceira socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano Agrícola				Total
	2001	2002	2003	2004	
	Mg ha ⁻¹				
RB 73 – 9735	37,6 a	17,2 abc	25,9 cd	22,9 bc	103,6 ab
SP 79 – 2312	29,8 ab	20,3 ab	34,2 abc	28,2 ab	112,5 a
RB 72 – 454	19,3 bc	23,2 ab	36,3 ab	26,4 abc	105,2 ab
RB 75 – 8540	35,2 ab	26,2 a	31,5 abc	17,4 bc	110,3 ab
RB 83 – 5089	34,0 ab	25,0 a	37,3 a	20,3 bc	116,6 a
RB 82 – 5336	30,3 ab	15,8 bc	25,4 cd	20,9 bc	92,4 ab
SP 70 – 1143	24,0 abc	20,5 ab	27,7 abcd	37,0 a	109,2 ab
Krakatau	13,1 c	19,5 ab	27,2 bcd	25,4 abc	85,2 b
Chunnee	8,6 c	10,3 c	18,1 d	12,8 c	49,8 c
CV (%)	36	28	18	33	15

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Em relação à matéria seca da palha (Tabela 31) e da bandeira (Tabela 32) de cana, nota-se que estas apresentaram potencial de adição ao solo de até 33 e 17 Mg ha⁻¹, respectivamente, nas 4 colheitas realizadas. No caso da palha, considerando esse mesmo período, a variedade que mais se destacou foi a SP 79-2312, mostrando diferença significativa em relação a variedade RB 75-8540, Chunnee e Krakatau. Já para a matéria seca da bandeira, a variedade que mais se destacou foi a Krakatau, diferindo estatisticamente de algumas variedades comerciais e também da Chunnee.

Tabela 31 - Produção de matéria seca total da palha de nove variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira, segunda e terceira socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Matéria seca total da Palha				Total
	Ano Agrícola				
	2001	2002	2003	2004	
	Mg ha ⁻¹				
RB 73 – 9735	6,9 a	5,8 bc	9,1 ab	7,2 abc	29,0 ab
SP 79 – 2312	3,9 abc	9,8 a	12,1 a	8,1 ab	33,9 a
RB 72 – 454	4,7 abc	6,5 bc	9,3 ab	6,0 abc	26,5 abc
RB 75 – 8540	3,4 bc	6,8 b	8,1 ab	4,0 c	22,3 bc
RB 83 – 5089	3,8 abc	6,9 b	11,1 a	4,3 c	26,1 abc
RB 82 – 5336	6,5 ab	5,5 bc	8,4 ab	6,8 abc	27,2 abc
SP 70 – 1143	3,2 c	7,0 b	9,0 ab	9,5 a	28,7 ab
Krakatau	3,6 abc	5,2 bc	9,4 ab	6,0 abc	24,2 bc
Chunnee	3,0 c	3,9 c	6,8 b	5,2 bc	18,9c
CV (%)	41	24	25	33	20

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Tabela 32 - Produção de matéria seca total da Bandeira de nove variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira, segunda e terceira socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Matéria seca total da Bandeira				
	Ano Agrícola				
	2001	2002	2003	2004	Total
	Mg ha ⁻¹				
RB 73 – 9735	1,2 b	2,1 bc	3,4 bc	3,1 ab	9,8 cd
SP 79 – 2312	2,2 ab	2,5 abc	4,5 ab	4,6 ab	13,8 abc
RB 72 – 454	1,6 ab	3,7 ab	5,4 a	5,5 ab	16,2 ab
RB 75 – 8540	2,6 a	2,9 abc	4,1 abc	2,9 ab	12,5 abcd
RB 83 – 5089	1,6 ab	3,8 ab	3,7 abc	2,9 ab	12,0 bcd
RB 82 – 5336	2,1 ab	2,2 bc	4,1 abc	3,6 ab	12,0 bcd
SP 70 – 1143	1,6 ab	2,4 bc	3,3 bc	5,7 a	13,0 abc
Krakatau	1,3 ab	4,4 a	5,5 a	5,8 a	17,0 a
Chunnee	1,3 ab	1,6 c	2,3 c	2,6 b	7,8 d
CV (%)	43	45	26	40	23

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Pela Tabela 33, pode-se observar o acúmulo de matéria seca de colmos, valendo destacar que os valores acumulados das 4 colheitas oscilaram entre 22 e 78 Mg ha⁻¹ para as diferentes variedades. Em relação a este parâmetro foi observada diferença significativa entre as variedades Krakatau e a maioria das variedades comerciais.

Tabela 33 - Produção de matéria seca total de colmos de nove variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira, segunda e terceira socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Matéria seca total de colmos				
	Ano Agrícola				
	2001	2002	2003	2004	Total
	Mg ha ⁻¹				
RB 73 – 9735	29,4 a	9,2 bcd	13,3 cde	12,5 bc	64,4 ab
SP 79 – 2312	23,7 ab	7,9 cd	17,6 abc	15,3 ab	64,5 ab
RB 72 – 454	12,9 bcd	12,9 abc	21,5 a	14,8 ab	62,1 ab
RB 75 – 8540	29,1 a	16,4 a	19,3 ab	10,4 bc	75,2 a
RB 83 – 5089	28,4 a	14,3 ab	22,4 a	13,0 abc	78,1 a
RB 82 – 5336	21,7 ab	7,9 cd	12,9 cde	10,5 bc	53,0 bc
SP 70 – 1143	19,1 abc	11,0 abc	15,4 bcd	21,6 a	67,1 ab
Krakatau	8,1 cd	9,7 bcd	12,2 de	13,5 abc	43,5 c
Chunnee	4,2 d	4,7 d	9,0 e	4,8 c	22,7 d
CV (%)	38	30	18	39	15

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

N-Total acumulado na parte aérea

No que diz respeito ao nitrogênio total acumulado na parte aérea das plantas (Tabela 34), este acompanhou o rendimento de colmos. Dentre as variedades que mais se destacaram nas diferentes colheitas realizadas pode-se citar: RB 82-5336, RB 83-5089, RB 72-454 e SP 70-1143 que demonstraram os maiores acúmulos, respectivamente, nas colheitas de cana-planta, 1^a, 2^a e 3^a socas. Em geral, não foi observada diferença significativa entre as variedades comerciais, com exceção das variedades RB 83-5089 e RB 73-9735 na segunda colheita e da SP 70-1143 em relação às variedades RB 83-5089, RB 75-8540 e RB 73-9735 na quarta colheita. Sendo o solo desse experimento bastante arenoso e pobre em N disponível, é provável que a principal fonte de N para as plantas, tenha sido a FBN, o que pode estar confirmando o potencial observado para as variedades, RB 72-454 e SP 70-1143, fato já observado no experimento 1. Ainda com relação a variedade RB 72-454, estes resultados podem estar confirmando a FBN observada em outros trabalhos (Resende, 2000; Polidoro *et al.* 2000; Boddey *et al.*, 2001; Xavier, 2002).

Tabela 34 - Nitrogênio total acumulado pela parte aérea de 9 variedades de cana de açúcar referente ao primeiro corte (cana planta), 2^a, 3^a, e 4^a cortes (socas), cultivadas num Planossolo sem adubação nitrogenada.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total da planta kg ha ⁻¹				
	2001	2002	2003	2004	Total
RB 73 – 9735	105,1 ab	49,6 bc	85,6 ab	65,9 b	306,2 ab
SP 79 – 2312	89,6 abc	70,0 abc	104,8 ab	87,9 ab	352,3 a
RB 72 – 454	75,9 abc	74,6 abc	112,6 a	82,9 ab	346,0 a
RB 75 – 8540	99,3 abc	75,4 ab	105,8 ab	47,1 b	327,6 a
RB 83 – 5089	104,9 ab	89,7 a	109,7 a	57,2 b	361,5 a
RB 82 – 5336	123,9 a	58,4 abc	79,7 ab	72,9 ab	334,9 a
SP 70 – 1143	74,2 abc	72,3 abc	89,0 ab	114,1 a	349,6 a
Krakatau	58,8 bc	68,3 abc	92,1 ab	88,5 ab	307,7 a
Chunnee	47,3 c	40,1 c	70,3 b	47,7 b	205,4 b
CV (%)	36	31	22	35	17

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Fazendo o desdobramento dessa Tabela nas diferentes partes (Tabela 35 a 37), constata-se que no caso da palhada estes valores oscilaram entre 90 e 127 kg ha⁻¹ acumulados durante os 4 cortes (Tabela 35). Valendo ressaltar que não foi observada diferença significativa entre as variedades.

Já em relação à bandeira (Tabela 36) e ao colmo (Tabela 37), durante esse mesmo período, os valores oscilaram entre 58 e 135, e 56 e 157, respectivamente. No caso da bandeira a variedade que mais se destacou foi a RB 72-454 que diferiu estatisticamente das variedades RB 73-9735 e Chunnee. Quando a parte avaliada foi o colmo, o maior acúmulo foi observado para a variedade RB 83-5089 que diferiu das duas variedades citadas anteriormente, e também das variedades Krakatau e RB 72-454.

Os resultados de nitrogênio acumulado na palha e na bandeira, corresponderam a praticamente 2/3 do N-total acumulado pela parte aérea da planta de cana-de-açúcar. Assim, considerando que a colheita de cana após a queima para facilitar o corte ainda é uma prática

usual, pode-se fazer uma estimativa da quantidade de nitrogênio do sistema solo-planta que vem sendo perdida ao longo dos anos na cultura de cana-de-açúcar. É possível que se essa quantidade de N não fosse perdida, seria suficiente para manter a fertilidade nitrogenada nos solos de canaviais e, talvez, eliminar a adubação nitrogenada da cultura, para o caso das variedades mais eficientes em FBN.

Tabela 35 - Nitrogênio total acumulado pela palha de 9 variedades de cana de açúcar referente ao primeiro corte (cana planta), 2^a, 3^a, e 4^a cortes (socas), cultivadas num Planossolo sem adubação nitrogenada.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total da palha kg ha ⁻¹				Total
	2001	2002	2003	2004	
RB 73 – 9735	39,7 a	19,9 bc	38,4 a	19,4 abc	117,4 a
SP 79 – 2312	16,2 b	35,6 a	48,2 a	27,3 ab	127,3 a
RB 72 – 454	24,5 ab	24,7 abc	43,0 a	15,7 bc	107,9 a
RB 75 – 8540	13,2 b	23,5 abc	47,1 a	11,9 c	95,7 a
RB 83 – 5089	16,8 b	23,7 abc	45,2 a	15,0 bc	100,7 a
RB 82 – 5336	32,9 ab	21,4 bc	32,4 a	18,7 abc	105,4 a
SP 70 – 1143	17,3 b	31,2 ab	36,8 a	30,6 a	115,9 a
Krakatau	19,4 b	19,1 bc	38,5 a	23,0 abc	100,0 a
Chunnee	19,2 b	16,4 c	34,6 a	20,4 abc	90,6 a
CV(%)	50	31	35	42	26

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Tabela 36 - Nitrogênio total acumulado pela bandeira de 9 variedades de cana de açúcar referente ao primeiro corte (cana planta), 2^a, 3^a, e 4^a cortes (socas), cultivadas num Planossolo sem adubação nitrogenada.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total da Bandeira kg ha ⁻¹				Total
	2001	2002	2003	2004	
RB 73 – 9735	11,3 b	16,3 bc	27,9 ab	25,3 ab	80,8 bc
SP 79 – 2312	22,0 ab	20,1 abc	28,6 ab	37,8 ab	108,5 ab
RB 72 – 454	18,4 ab	32,3 abc	38,0 a	46,7 a	135,4 a
RB 75 – 8540	27,5 a	24,7 abc	32,8 a	23,1 ab	108,1 ab
RB 83 – 5089	17,2 ab	31,5 ab	30,4 ab	23,2 ab	102,3 ab
RB 82 – 5336	21,5 ab	17,2 bc	26,4 ab	32,0 ab	97,1 abc
SP 70 – 1143	18,7 ab	20,0 abc	30,8 ab	48,1 a	117,6 ab
Krakatau	14,5 ab	35,7 a	36,5 a	42,1 ab	128,8 a
Chunnee	12,6 b	11,6 c	16,2 b	17,8 b	58,2 c
CV(%)	43	47	30	46	23

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Tabela 37 - Nitrogênio total acumulado pelo colmo de 9 variedades de cana de açúcar referente ao primeiro corte (cana planta), 2^a, 3^a, e 4^a cortes (socas), cultivadas num Planossolo sem adubação nitrogenada.

Variedades de Cana-de-açúcar	N-total do colmo kg ha ⁻¹				Total
	2001	2002	2003	2004	
RB 73 – 9735	53,9 ab	13,2 c	19,2 cd	21,0 ab	107,3 bc
SP 79 – 2312	51,3 abc	14,1 bc	27,8 ab	22,7 ab	115,9 abc
RB 72 – 454	32,9 abc	17,4 bc	31,5 ab	20,4 b	102,2 bc
RB 75 – 8540	58,5 ab	27,0 ab	25,7 bc	11,9 b	123,1 ab
RB 83 – 5089	70,7 a	34,3 a	33,9 a	18,8 b	157,7 a
RB 82 – 5336	69,4 a	19,7 bc	20,8 cd	22,2 ab	132,1 ab
SP 70 – 1143	38,0 abc	21,0 abc	21,3 cd	35,2 a	115,6 abc
Krakatau	24,8 bc	13,4 c	17,0 d	23,2 ab	78,4 cd
Chunnee	15,4 c	11,9 c	19,4 cd	9,4 b	56,1 d
CV(%)	47	38	16	39	22

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Fisher (LSD, p=0,05).

Contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da cultura de cana de açúcar.

De uma maneira geral, em todas as colheitas (Tabela 38 a 40), o valor de $\delta^{15}\text{N}$ nas plantas testemunhas foram iguais ou significativamente maiores que os observados na cana-de-açúcar, possibilitando a aplicação da técnica de $\delta^{15}\text{N}$ para a estimativa da contribuição da FBN para a cana-de-açúcar, como estipulado por Shearer e Kohl, (1986). A estimativa da contribuição da FBN para as plantas de cana-de-açúcar, neste estudo, foi realizada somente quando o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ da espécie de planta testemunha foi significativamente maior que o observado na planta de cana-de-açúcar, avaliados pelo teste de t-student, como proposto por Boddey *et al.* (2001).

A contribuição da FBN para as variedades comerciais de cana-de-açúcar avaliadas aos 18 meses de cultivo (cana planta) variou entre 31 e 43% (Tabela 38). No Brasil, as novas variedades de cana-de-açúcar que vem sendo produzidas estão sendo selecionadas principalmente por seus altos rendimentos e tolerância a condições de estresse, como a baixa fertilidade dos solos. Um exemplo é a variedade RB 83-5089 que comportou-se como uma variedade de alto rendimento e eficiência para o processo de FBN, superando significativamente a variedade SP 70-1143. Vale destacar que as variedades desse grupo (RBs), têm o processo de melhoramento desenvolvido em condições de baixa disponibilidade de N no solo, podendo estar “naturalmente” sendo selecionadas para alta eficiência de FBN. A variedade Krakatau confirmou a eficiência para FBN já observada no experimento 1 e em outros trabalhos (Urquiaga *et al.*, 1992).

Comparando-se a contribuição da FBN em cana-planta para as variedades que são comuns no 1^o e 2^o experimentos, pode-se observar que quando às condições de fertilidade são inferiores como é o caso do Planossolo, há a necessidade da planta em associação com a bactéria fixadora, utilizar melhor o seu potencial para FBN, mostrando valores de contribuição maiores do que os encontrados no Argissolo.

Tabela 38 – Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (%Ndfa) em nove genótipos de cana-de-açúcar, estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N , utilizando-se sorgo e milho como testemunhas, aos dezoito meses após o plantio (ciclo de cana planta).

Variedades de Cana-de-açúcar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%Ndfa* ¹
RB 73 – 9735	3,18 bc	39,77*
SP 79 – 2312	3,32 bc	37,12*
RB 72 – 454	3,62 bc	31,44**
RB 75 – 8540	3,05 bc	42,11**
RB 83 – 5089	2,99 c	43,24*
RB 82 – 5336	3,58 bc	32,20*
SP 70 – 1143	4,00 ab	NS
Krakatau	3,15 bc	40,34*
Chunnee	4,63 a	NS

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da %Ndfa utilizou-se o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ (5,28 ‰) observados nas plantas testemunhas, Milho (*Zea mays*) e Sorgo (*Sorghum bicolor*), 5,12 ‰ e 5,45 ‰, respectivamente.

Em relação à 2^a colheita (2002) foi observado uma contribuição da FBN de 20 a 52% (Tabela 39). Neste ano, a variedade que mais se destacou foi a Krakatau, confirmando novamente o potencial para FBN observado em pesquisas anteriores. Entre as variedades comerciais, os resultados foram muito similares, valendo destacar como mais eficientes as variedades SP 79 – 2312 e RB 72 – 454.

Para o terceiro ano de avaliação (2^a soca), a contribuição da FBN variou de 35 a 43% (Tabela 40). Dentre as variedades que mais se destacaram, podemos citar novamente as SP 79-2312 e RB 72-454, confirmando dessa forma os resultados de outros estudos (Urquiaga *et al.*, 1989; 1992; Resende, 2000; Polidoro *et al.* 2000; Boddey *et al.*, 2001; Xavier, 2002), assim como os resultados obtidos no 1^o experimento do presente trabalho, e também a variedade RB 83-5089.

Tabela 39 – Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (%Ndfa) estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), em nove variedades de cana-de-açúcar, ciclo 1^a soca.

Variedades de Cana-de-açúcar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	%Ndfa* ¹
RB 73 – 9735	3,43 a	20,52*
SP 79 – 2312	3,00 a	30,48**
RB 72 – 454	3,15 a	27,01**
RB 75 – 8540	3,26 a	24,61*
RB 83 – 5089	3,50 a	NS
RB 82 – 5336	3,32 a	23,07*
SP 70 – 1143	3,43 a	20,52*
Krakatau	2,07 b	52,01*
Chunnee	3,48 a	NS

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da %Ndfa utilizou-se o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ (4,32 ‰) observados nas plantas testemunhas *Baccharis trimera* (Vassourinha), *Panicum maximum* (Capim colônia) e *Andropogon bicornis* (Capim Rabo de Burro) que foram: 4,43 ‰, 4,48 ‰ e 4,07 ‰, respectivamente.

Tabela 40 – Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (%Ndfa) estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), em nove variedades de cana-de-açúcar, ciclo 2^a soca.

Variedades de cana-de-açúcar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) cana-de-açúcar	%Ndfa* ¹
RB 73-9735	2,68 abc	35,91**
SP 79-2312	2,35 c	43,65*
RB 72-454	2,43 c	41,89**
RB 75-8540	3,43 a	NS
RB 83-5089	2,43 c	41,81*
RB 82-5336	2,58 c	38,30*
SP 70-1143	3,35 ab	NS
Krakatau	2,59 c	37,87*
Chunnee	2,63 bc	37,30*

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da %Ndfa utilizou-se o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ (4,18 ‰) observados nas plantas testemunhas *Cenchrus echinatus* (Carrapicho), *Bidens pilosa* (Picão preto), *Emilia sonchifolia* (Pincel), *Commelina benghalensis* (Trapoeraba) e *Richardia brasiliensis* (Poaia branca) que foram; 4,24 ‰, 4,31‰, 4,12‰, 3,97‰ e 4,26‰ respectivamente.

Com relação a quantificação da contribuição da FBN referente a última colheita (ano de 2004), esta variou de 40 a 55% (Tabela 41), e as variedades que apresentaram as maiores contribuições foram RB 82-5336, SP 70-1143 e RB 75-8540.

Quando se observa os últimos três anos de avaliação deste experimento (1^a, 2^a e 3^a soca), percebe-se que as variedades comerciais SP 79-2312, RB 72-454 e Krakatau, confirmaram novamente o potencial para FBN observado no experimento 1, valendo destacar também as variedades RBs que na maioria das avaliações mostraram altas contribuições da FBN, e até então pouca informação tinha sido gerada a respeito da contribuição da FBN para essas variedades.

Em geral, quando considera-se a contribuição da FBN em todas as colheitas, observamos que as variedades comerciais foram beneficiadas de forma semelhante, alternando-se quanto às máximas contribuições.

A grande surpresa novamente foi o valor de contribuição da FBN observado para a variedade Chunnee, que em algumas colheitas apresentou uma contribuição bem próxima ou até superior a contribuição observada para as variedades SP 70-1143 e Krakatau.

Tabela 41 – Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (%Ndfa) estimada pela técnica de abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$), em nove variedades de cana-de-açúcar, ciclo 3ª soca.

Variedades de cana-de-açúcar	$\delta^{15}\text{N}$ (‰) cana-de-açúcar	%Ndfa* ¹
RB 73-9735	2,64 a	40,86**
SP 79-2312	2,26 a	49,44**
RB 72-454	2,38 a	46,83**
RB 75-8540	2,14 a	52,20**
RB 83-5089	2,43 a	45,64**
RB 82-5336	2,00 a	55,63**
SP 70-1143	2,03 a	54,66**
Krakatau	2,42 a	45,93**
Chunnee	2,63 a	41,16**

** significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t.

*1 Para o cálculo da %Ndfa utilizou-se o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ (4,54 ‰) observados nas plantas testemunhas *Cenchrus echinatus* (Carrapicho), *Bidens pilosa* (Picão preto), *Emilia sonchifolia* (Pincel) e *Richardia brasiliensis* (Poaia branca) que foram: 4,36 ‰, 3,77‰, 5,32‰ e 4,71‰, respectivamente.

Com relação a quantidade de N fixado (Tabela 42), quando consideram-se todas as variedades estudadas, observa-se que estes valores variaram de 8 a 46 kg ha⁻¹, 10 a 21 kg ha⁻¹, 19 a 47 kg ha⁻¹ e 19 a 63 kg ha⁻¹, respectivamente para o ciclo de cana-planta, 1ª soca, 2ª soca e 3ª soca. Dentre as variedades comerciais que mais se destacaram, pode-se citar a variedade RB 83-5089 em cana-planta, as variedades SP 79-2312 e RB 72-454, e SP 70-1143 que, respectivamente, no 3ª e 4ª corte confirmaram o potencial para fixação biológica de nitrogênio já observado no experimento 1.

Tabela 42 – Quantidade de nitrogênio derivado da fixação biológica de nitrogênio em dez variedades de cana-de-açúcar, nos ciclos de cana-planta, primeira, segunda, terceira e quarta socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	N Proveniente da FBN kg/ha			
	2001	2002	2003	2004
RB 73-9735	41,8 ab	10,3 a	31,1 ab	27,1 b
SP 79-2312	33,8 abc	21,1 a	46,3 a	43,7 ab
RB 72-454	23,1 abc	20,1 a	47,2 a	38,8 ab
RB 75-8540	41,2 ab	18,8 a	20,4 b	25,0 b
RB 83-5089	46,8 a	16,4 a	44,4 a	25,4 b
RB 82-5336	40,3 ab	13,6 a	29,1 ab	28,3 b
SP 70-1143	16,2 bc	13,8 a	19,1 b	63,6 a
Krakatau	24,1 abc	10,3 a	34,8 ab	42,0 ab
Chunnee	8,3 c	20,5 a	28,4 ab	19,1 b
CV(%)	47	41	37	44

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de LSD (p=0,05)

Nesse experimento, ficou novamente evidenciada a importância do processo de FBN para a sustentabilidade dos níveis de produtividade desta cultura, em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio do solo, e principalmente, levando em consideração que nesse experimento nunca foi adicionado N-fertilizante.

Deve-se ressaltar que a quantidade de nitrogênio acumulado na palha e na bandeira da cana, contendo parte do N fixado pela cultura, que normalmente são queimadas, equivale a grande parte do total de nitrogênio acumulado pela parte aérea da planta, produzindo um balanço praticamente nulo com o N-total exportado pelos colmos. Isso indica a importância de se selecionar variedades de cana-de-açúcar capazes de receber contribuições da FBN, assim como de não se queimar a cana antes do corte para que a cultura possa ser considerada uma cultura sustentável.

4.3 Experimento 3 Produção de colmos Frescos

Em relação ao rendimento de colmos em cana-planta, a variedade que mais se destacou foi a SP 70-1143, mostrando diferença significativa em relação às variedades Krakatau, Chunnee, RB 83-5089 e RB 73-9735. Nessa colheita, destacaram-se também as variedades RB 72-454, SP 71-6163 e RB 82-5336 que tiveram rendimentos semelhantes a SP 70-1143 (Tabela 43).

Na colheita da 1ª e 2ª socas (Tabela 43), a variedade SP 70-1143 confirmou o seu alto potencial produtivo em solos com baixos níveis em N disponível, com produtividade significativamente superior a todas as variedades estudadas. As diferenças no rendimento de colmos obtidas entre a fase de cana planta e 1ª soca são esperadas, uma vez que no primeiro ciclo a cana foi cortada com 18 meses e no segundo com 12 meses. No caso das variedades Krakatau e Chunnee, os baixos rendimentos encontrados podem ser explicados pelo fato de não serem variedades comerciais melhoradas.

Tabela 43 - Produção de colmos frescos em dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta (18 meses – Ano agrícola 2002/03), 1ª soca (12 meses - Ano agrícola 2003/04) e 2ª soca (12 meses - Ano agrícola 2004/05).

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano agrícola		
	2002/03	2003/04	2004/05
	Produtividade		
	Mg/ha		
SP 79 – 2312	129,8 ab	60,7 bc	61,0 b
RB 75 -8540	120,4 ab	70,6 bc	72,6 b
SP 71-6163	145,0 ab	70,7 bc	72,0 b
RB 72-454	153,1 ab	89,8 bc	81,1 b
RB 83 – 5089	115,0 b	67,5 bc	70,0 b
RB 82-5336	136,6 ab	71,7 bc	72,6 b
SP 70-1143	189,2 a	134,2 a	153,3 a
RB 73-9735	99,4 bc	44,6 c	47,5 bc
KRAKATAU	33,6 c	39,8 cd	64,0 b
CHUNNEE	31,2 c	2,6 d	0,4 c
CV(%)	25	25	30

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Produção de matéria seca da parte aérea da cana-de-açúcar

Considerando-se a matéria seca total da parte aérea da cana-de-açúcar (colmo + palha + bandeira), os valores totais das 3 colheitas oscilaram entre 25 e 253 Mg ha⁻¹ (Tabela 44) para as diferentes variedades. Os valores aqui encontrados indicam um acúmulo anual de até 84 Mg ha⁻¹ de matéria seca. Assim como para produção de colmos, a variedade comercial que mais se destacou foi a SP 70-1143 mostrando diferença significativa em relação a todas as variedades estudadas. Esses resultados confirmam o potencial observado para esta variedade tanto no 1º experimento, quanto em trabalhos anteriores (Urquiaga *et al.*, 1992).

Tabela 44 - Produção de matéria seca total da parte aérea de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira e segunda socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano Agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	Mg ha ⁻¹			
SP 79 – 2312	73,7 ab	36,3 b	39,7 c	149,7 b
RB 75 -8540	55,8 bc	37,2 b	41,3 c	134,3 b
SP 71-6163	71,8 ab	38,1 b	43,5 bc	153,4 b
RB 72-454	76,1 ab	45,6 b	46,0 bc	167,7 b
RB 83 – 5089	54,1 bc	32,0 b	38,6 c	124,7 b
RB 82-5336	74,4 ab	39,3 b	50,9 bc	164,6 b
SP 70-1143	96,1 a	68,4 a	88,9 a	253,4 a
RB 73-9735	50,6 bc	28,1 b	32,8 c	111,5 b
KRAKATAU	31,8 c	35,9 b	66,9 ab	134,6 b
CHUNNEE	22,7 c	2,6 c	0,5 d	25,8 c
CV (%)	23	21	22	17

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Em relação à matéria seca da palha de cana, nota-se que esta representou um potencial de adição ao solo de 10 a 81 Mg ha⁻¹ nas 3 colheitas, o que equivale à cerca de 27 Mg ha⁻¹ por colheita, sendo este valor observado para a variedade SP 70-1143 (Tabela 45).

Pela Tabela 46, observa-se que o acúmulo de matéria seca de colmos de 3 colheitas oscilou entre 12 e 147 Mg ha⁻¹ para as diferentes variedades. O baixo valor encontrado para a variedade Chunnee pode ser explicado pela baixa tolerância às condições de forte limitação de N do solo (Urquiaga *et al.*, 1992) e/ou pelo efeito de sombreamento, já que essa variedade apresenta um crescimento mais lento, e por este motivo pode ter sido sombreada pelas demais variedades, implicando em produções cada vez menores.

Tabela 45 - Produção de matéria seca total da palha de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira e segunda socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano Agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	Mg ha ⁻¹			
SP 79 - 2312	24,6 a	14,2 b	18,6 cd	57,4 bc
RB 75 -8540	15,5 abc	11,9 b	17,6 cd	45,0 cd
SP 71-6163	23,3 a	13,9 b	18,9 cd	56,1 bc
RB 72-454	18,8 abc	14,4 b	16,9 d	50,1 bcd
RB 83 - 5089	14,5 abc	9,1 b	14,4 d	38,0 d
RB 82-5336	23,3 a	16,1 ab	25,2 bc	64,6 ab
SP 70-1143	22,1 ab	22,3 a	36,3 a	80,7 a
RB 73-9735	16,4 abc	11,3 b	16,2 d	43,9 cd
KRAKATAU	12,1 bc	13,6 b	32,1 ab	57,8 bc
CHUNNEE	9,3 c	1,2 c	0,2 e	10,7 e
CV (%)	23	24	15	13

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Tabela 46 - Produção de matéria seca total do colmo de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira e segunda socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano Agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	Mg ha ⁻¹			
SP 79 - 2312	42,5 ab	18,8 bc	18,1 b	79,4 bc
RB 75 -8540	34,8 bc	20,5 bc	20,9 b	76,2 bc
SP 71-6163	42,1 ab	20,6 bc	21,6 b	84,3 bc
RB 72-454	50,1 ab	26,9 ab	24,6 b	101,6 ab
RB 83 - 5089	35,7 bc	20,1 bc	21,4 b	77,2 bc
RB 82-5336	43,6 ab	19,8 bc	21,4 b	84,8 bc
SP 70-1143	62,8 a	38,8 a	45,5 a	147,1 a
RB 73-9735	29,2 bc	13,9 c	14,4 bc	57,5 bcd
KRAKATAU	12,6 c	16,1 bc	24,0 b	52,7 cd
CHUNNEE	11,8 c	0,9 d	0,1 c	12,8 d
CV (%)	28	25	31	22

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Na tabela 47, pode-se observar o acúmulo de matéria seca da bandeira, valendo destacar que no final das 3 colheitas, algumas variedades mostraram um potencial de acúmulo maior que 24 Mg ha⁻¹. Para este parâmetro as variedades que mais se destacaram foram SP 70-1143 e Krakatau, mostrando diferença estatística em relação a todas as variedades estudadas.

Tabela 47 - Produção de matéria seca total da bandeira de dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta, primeira e segunda socas.

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano Agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	Mg ha ⁻¹			
SP 79 - 2312	6,5 bc	3,2 bc	2,9 cd	12,6 b
RB 75 -8540	5,4 bc	4,8 ab	2,8 cd	13,0 b
SP 71-6163	6,3 bc	3,6 abc	3,0 c	12,9 b
RB 72-454	7,2 bc	4,1 abc	4,3 bc	15,6 b
RB 83 - 5089	3,9 cd	2,6 bc	2,7 cd	9,2 bc
RB 82-5336	7,4 b	3,4 abc	4,3 bc	15,1 b
SP 70-1143	11,1 a	7,2 a	6,9 b	25,2 a
RB 73-9735	5,0 bc	2,8 bc	2,1 cd	9,9 b
KRAKATAU	7,0 bc	6,2 ab	10,7 a	23,9 a
CHUNNEE	1,5 d	0,4 c	0,1 d	2,0 c
CV (%)	24	39	28	22

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

N-Total acumulado na parte aérea

No que diz respeito ao total de N acumulado pela planta nas três colheitas realizadas (Tabela 48), os resultados acompanharam a produção de colmos. Dessa forma, a variedade que mais se destacou foi a SP 70-1143, mostrando diferença significativa em relação a todas as variedades comerciais na 1^a e 2^a soca, e também em relação ao acumulado nos 3 primeiros anos. Este desempenho não foi observado no ciclo de cana-planta, onde não foi observada diferença significativa em relação às variedades comerciais RB 82-5336, SP 79-2312, SP 71-6163 e RB 72-454. As altas produções e acúmulo de N observados para estas três últimas variedades podem estar confirmando a alta potencialidade destas para FBN, o que já foi observado em outros trabalhos (Urquiaga *et al.*, 1989; 1992; Resende, 2000; Polidoro *et al.* 2000; Boddey *et al.*, 2001; Xavier, 2002), e no caso específico das variedades SP 70-1143 e RB 82-5336, pode estar confirmando os resultados obtidos, respectivamente nos experimentos 1 e 2 desta tese.

Tabela 48 - Conteúdo de N na parte aérea das plantas em dez variedades de cana-de-açúcar, avaliadas nos ciclos de cana-planta (18 meses – Ano agrícola 2002/03), 1ª soca (12 meses - Ano agrícola 2003/04) e ciclo de 2ª soca (12 meses - Ano agrícola 2004/05).

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	kg/ha			
SP 79 - 2312	132,5 ab	65,5 b	68,2 c	266,2 bc
RB 75 -8540	98,0 bc	71,4 b	70,1 c	239,5 bc
SP 71-6163	153,8 ab	73,1 b	78,4 bc	305,3 bc
RB 72-454	132,4 ab	73,3 b	67,7 bc	273,4 bc
RB 83 - 5089	89,0 bc	47,9 bc	61,9 c	198,8 c
RB 82-5336	149,0 ab	67,9 b	94,8 b	311,7 bc
SP 70-1143	185,6 a	124,3 a	150,8 a	460,7 a
RB 73-9735	99,8 bc	49,8 bc	63,4 c	213,0 bc
KRAKATAU	87,5 bc	86,9 ab	156,1 a	330,5 b
CHUNNEE	55,8 c	7,9 c	1,6 d	65,3 d

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p=0,05$.

Em relação ao nitrogênio acumulado no Colmo (Tabela 49), Palha (Tabela 50) e bandeira (Tabela 51), foi observado que os valores oscilaram, respectivamente, entre 19 e 121 kg ha^{-1} , 33 e 178 kg ha^{-1} e 11 e 181 kg ha^{-1} , quando considera-se a soma das 3 primeiras colheitas.

Tabela 49 - Nitrogênio total acumulado pelo colmo de 10 variedades de cana de açúcar referente ao primeiro corte (cana planta), 2ª e 3ª cortes (socas).

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	kg/ha			
SP 79 - 2312	37,2 abc	17,2 b	18,0 bc	72,4 bc
RB 75 -8540	23,6 bcd	15,4 b	12,7 cd	51,7 cd
SP 71-6163	49,1 a	21,8 ab	22,9 bc	93,8 ab
RB 72-454	43,8 ab	20,4 ab	19,4 bc	83,6 abc
RB 83 - 5089	26,6 abcd	14,0 bc	18,8 bc	59,4 bcd
RB 82-5336	41,6 abc	19,1 ab	22,4 bc	83,1 abc
SP 70-1143	45,8 ab	31,1 a	44,7 a	121,6 a
RB 73-9735	23,6 bcd	10,9 bc	14,9 bc	49,4 cd
KRAKATAU	12,0 d	18,6 ab	29,0 b	59,6 bcd
CHUNNEE	18,0 cd	1,7 c	0,2 d	19,9 d
CV (%)	30	31	29	23

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, $p=0,05$.

Tabela 50 - Nitrogênio total acumulado pela palha de 10 variedades de cana de açúcar referente ao primeiro corte (cana planta), 2^a e 3^a cortes (socas).

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	kg/ha			
SP 79 - 2312	53,3 a	27,1 b	30,2 bc	110,6 bcd
RB 75 -8540	36,3 a	21,8 b	37,7 b	95,8 cd
SP 71-6163	59,1 a	25,8 b	37,0 b	121,9 bc
RB 72-454	42,5 a	26,7 b	39,8 b	109,0 bcd
RB 83 - 5089	37,1 a	17,9 bc	27,8 bc	82,8 d
RB 82-5336	60,8 a	27,3 b	48,0 ab	136,1 b
SP 70-1143	60,3 a	44,2 a	74,4 a	178,9 a
RB 73-9735	41,2 a	21,8 b	38,0 b	101,0 bcd
KRAKATAU	31,8 a	29,3 ab	56,0 ab	117,1 bcd
CHUNNEE	29,0 a	3,9 c	0,7 c	33,6 e
CV (%)	30	25	39	15

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Tabela 51 - Nitrogênio total acumulado pela bandeira de 10 variedades de cana de açúcar referente ao primeiro corte (cana planta), 2^a e 3^a cortes (socas).

Variedades de Cana-de-açúcar	Ano agrícola			Total
	2002/03	2003/04	2004/05	
	kg/ha			
SP 79 - 2312	41,9 b	21,1 bc	19,9 b	82,9 c
RB 75 -8540	38,0 bc	34,0 ab	19,6 b	91,6 c
SP 71-6163	45,5 b	25,4 abc	22,0 b	92,9 c
RB 72-454	46,0 b	26,2 abc	27,0 b	99,2 bc
RB 83 - 5089	25,2 bc	15,9 bc	19,4 b	60,5 cd
RB 82-5336	46,5 b	21,4 bc	31,0 b	98,9 bc
SP 70-1143	79,5 a	48,8 a	53,4 a	181,7 a
RB 73-9735	34,9 bc	16,9 bc	14,3 bc	66,1 cd
KRAKATAU	43,5 b	38,9 ab	71,0 a	153,4 ab
CHUNNEE	8,8 c	2,2 c	0,7 c	11,7 d
CV (%)	32	44	28	23

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, p=0,05.

Contribuição da FBN na nutrição nitrogenada da cultura de cana de açúcar.

Na tabela 52 pode-se observar os valores de enriquecimento de ¹⁵N do perfil do solo, referente ao estudo que foi realizado em vaso (casa de vegetação). Vale ressaltar que a média ponderada da planta inteira das diferentes testemunhas utilizadas (Trapoeraba, Pé de Galinha e Sorgo) corresponde ao valor médio de enriquecimento de ¹⁵N de cada testemunha nas diferentes profundidades. Os resultados encontrados demonstram que houve pequena variação em relação aos valores de enriquecimento de ¹⁵N, não sendo observada diferença significativa

e um comportamento muito similar entre as testemunhas estudadas. Vale destacar que os valores de enriquecimento encontrados para Pé de galinha e Sorgo foram bem próximos aos encontrados para a média das espécies amostradas na área experimental (Tabela 54 a 56), e utilizadas como testemunha para o cálculo da FBN, o que dá muita consistência aos resultados obtidos.

Tabela 52 – Valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ para a média ponderada (raiz e parte aérea) das diferentes testemunhas utilizadas (Trapoeiraba, Pé de Galinha e Sorgo) crescidas em amostras de diferentes profundidades do solo.

Testemunha	Valores de $\delta^{15}\text{N}$ Média Ponderada (Raiz-Parte aérea))
Trapoeiraba	0.02458 a
Pé de galinha	0.02922 a
Sorgo	0.03070 a
CV (%)	8

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de tukey ($p=0,05$).

Em relação aos valores de enriquecimento encontrados para as diferentes profundidades (Tabela 53), que constituiu o principal objetivo desse estudo complementar, também não foi observado diferença significativa, porém houve uma tendência da camada superficial apresentar os menores valores. A explicação para este fato pode ser devido a entrada de N proveniente da FBN nas camadas superficiais em consequência da morte das raízes das plantas de cana de açúcar contendo N derivado da FBN. Vale destacar que a média de enriquecimento de $\delta^{15}\text{N}$ quando consideram-se todas as profundidades avaliadas foi de 0,028165, sendo novamente bem próximos aos encontrados para a média das espécies utilizadas como testemunha na área experimental (Tabela 54 a 56).

Tabela 53 – Valores de $\delta^{15}\text{N}$ nas diferentes profundidades, considerando os valores médios obtidos para a média ponderada da raiz e parte aérea das diferentes testemunhas utilizadas.

Profundidade	Valores de $\delta^{15}\text{N}$ Média Ponderada (Raiz-Parte aérea))
0 – 10 cm	0.02488 a
10 – 20 cm	0.02805 a
20 – 30 cm	0.02934 a
30 – 40 cm	0.02795 a
40 – 50 cm	0.03048 a
50 – 60 cm	0.02829 a
CV (%)	8

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de tukey ($p=0,05$).

De uma maneira geral, com exceção da colheita da 1ª soca (Tabela 55), onde as plantas de cana-de-açúcar mostraram um valor de enriquecimento maior do que os valores de enriquecimento de ^{15}N das plantas testemunhas, em todas as outras colheitas (Tabela 54 e 56), o valor de enriquecimento de ^{15}N nas plantas testemunhas foram iguais ou significativamente maiores que os observados na cana-de-açúcar, possibilitando a aplicação da técnica de

diluição isotópica de ^{15}N para a estimativa da contribuição da FBN para a cana-de-açúcar, como estipulado por Shearer e Kohl, (1986). A estimativa da contribuição da FBN para as plantas de cana-de-açúcar, neste estudo, foi realizada somente quando o valor médio de enriquecimento de ^{15}N da espécie de planta testemunha foi significativamente maior que o observado na planta de cana-de-açúcar, avaliados pelo teste de t-student, como proposto por Boddey *et al.* (2001).

Quando considera-se a contribuição da FBN em cana-planta (Tabela 54), as variedades que mostraram as maiores contribuições, foram as mesma que se destacaram em relação ao rendimento de colmos e acumulação de N, evidenciando assim a importância deste processo para a produtividade desta cultura nas condições que foi realizado esse experimento.

De acordo com a variedade de cana-de-açúcar, as contribuições médias de FBN, em cana planta, variaram entre 7 e 19%. A variedade Chunnee, considerada uma testemunha não-fixadora nos primeiros estudos (Urquiaga *et al.*, 1992), também apresentou diluição isotópica de ^{15}N significativa em seus tecidos em comparação ao observado nas espécies de crescimento espontâneo existentes no mesmo local, o que se traduziu em uma contribuição da FBN de cerca de 10%.

Neste primeiro período de avaliação (cana planta), as contribuições da FBN observadas para cana-planta foram condizentes, porém um pouco abaixo do que tem sido relatado para a cultura em condições de campo utilizando-se a técnica de abundância natural de ^{15}N (Yoneyama *et al* 1997; Boddey *et al* 2003).

Tabela 54 – Contribuição percentual da fixação biológica do nitrogênio (%Ndfa) estimada pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N , em dez variedades de cana-de-açúcar num Argissolo Vermelho Amarelo, ciclo cana planta. Safra 2002-2003.

Variedades de Cana-de-açúcar	Contribuição da FBN (%) ^{*1}	
	Átomos de ^{15}N excesso	Média das 3 testemunhas
		0,02965
SP 79 – 2312	0,02633	NS
RB 75 –8540	0,02755	NS
SP 71-6163	0,02713	NS
RB 72-454	0,02500	15,7*
RB 83 – 5089	0,02734	7,8*
RB 82-5336	0,02662	10,2*
SP 70-1143	0,02392	19,3*
RB 73-9735	0,02740	NS
KRAKATAU	0,02498	NS
CHUNNEE	0,02649	10,7**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da FBN foi utilizado a média de enriquecimento de $\delta^{15}\text{N}$ (0,02965) de três espécies não fixadoras: *Emilia sonchifolia* - Falsa Serralha (0,02956); *Cynodon dactylon* - Grama Seda (0,03030) e *Chamaesyce hyssopifolia* - Burra Leiteira (0,02909)

No 2º ano foi observado que as variedades de cana-de-açúcar mostraram na maioria das avaliações, um enriquecimento de ^{15}N maior do que o das testemunhas utilizadas (Tabela 55). Dessa forma, se fosse calculada a contribuição da FBN nesse ano, seriam observados, em geral, valores negativos de FBN, fato este que não foi observado à nível de campo

(experimento 2) para essas mesmas variedades utilizando a metodologia de abundância natural de ^{15}N . Assumindo-se que as espécies espontâneas não se beneficiam do processo de FBN, se esperaria que estas e as variedades de cana apresentassem enriquecimentos de ^{15}N semelhantes, numa condição de contribuição nula da FBN para a cana. Os resultados de enriquecimento de ^{15}N , observados na primeira socaria (Tabela 55), sustentariam essa hipótese.

Tabela 55 – Valores de enriquecimento de $\delta^{15}\text{N}(\%)$ observado para as diferentes variedade de cana-de-açúcar e para as plantas testemunhas no ciclo de 1ª soca, Safra 2003-2004.

Variedades cana-de-açúcar	Átomos de ^{15}N excesso
SP 79 – 2312	0,02762
RB 75 – 8540	0,02971
SP 71-6163	0,02998
RB 72-454	0,02936
RB 83 – 5089	0,02999
RB 82-5336	0,02937
SP 70-1143	0,02960
RB 73-9735	0,03029
KRAKATAU	0,02998
CHUNNEE	0,02937
Plantas Testemunhas	Átomos de ^{15}N excesso
<i>Emilia sonchifolia</i> (Falsa Serralha)	0,02926
<i>Chamaesyce hyssopifolia</i> (Burra Leiteira)	0,02814
<i>Richardia brasiliensis</i> (Poaia Branca)	0,03045
Média das testemunhas	0,02928

Na terceira colheita, novamente os valores de enriquecimento de ^{15}N encontrados para as variedades de cana-de-açúcar foram menores do que os encontrados para a testemunha, sendo observado uma contribuição da FBN, que variou de 8 a 15% (Tabela 56), sendo estes valores bem próximos dos encontrados para cana-planta.

Tabela 56 – Contribuição percentual da fixação biológica do nitrogênio (%Ndfa) estimada pela técnica diluição isotópica de ^{15}N , em dez variedades de cana-de-açúcar num Argissolo Vermelho Amarelo, ciclo 2^a soca. Safra 2004-2005.

Variedades de Cana-de-açúcar	Contribuição da FBN (%) ^{*1} Média das 3 testemunhas	
	Átomos de ^{15}N excesso	
		0,02823
SP 79 – 2312	0,02451	13,2**
RB 75 – 8540	0,02548	9,7*
SP 71-6163	0,02534	10,2**
RB 72-454	0,02499	NS
RB 83 – 5089	0,02350	NS
RB 82-5336	0,02608	NS
SP 70-1143	0,02499	11,5**
RB 73-9735	0,02580	8,6*
KRAKATAU	0,02542	NS
CHUNNEE	0,02397	15,1**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste t, * significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste t, NS não significativo.

*1 Para o cálculo da FBN foi utilizado a média de enriquecimento de $\delta^{15}\text{N}$ (0,02823) de três espécies não fixadoras: *Emilia sonchifolia* - Pincel (0,02919); *Andropogon bicornis* - Rabo de Burro (0,02768) e *Chamaesyce hyssopifolia* - Burra Leiteira (0,02781)

Como foi dito anteriormente, quando consideram-se essas mesmas variedades em condições de campo (experimento 2), observa-se um potencial de contribuição da FBN muito diferente, principalmente quando considera-se os valores de contribuição observados para 1^a e 2^a socas.

As dúvidas que foram levantadas mostram a importância de se trabalhar com mais de uma técnica para a quantificação da FBN. No trabalho realizado por Urquiaga *et al.*, (1992), se trabalhou com a técnica de diluição isotópica de ^{15}N para quantificar a FBN em diferentes variedades de cana, durante 3 anos consecutivos. Os valores de contribuição da FBN foram confirmados pela técnica de balanço do N-total no sistema solo-planta no mesmo estudo.

Neste trabalho, também foi utilizada a técnica de balanço do N-total no sistema solo-planta para confirmar os resultados obtidos pela técnica de diluição isotópica de ^{15}N , sendo os resultados apresentados na Tabela 57. Nesse balanço pode-se concluir que mesmo algumas variedades, como Krakatau, SP 71-6163, RB 72-454 e principalmente a variedade SP 70-1143, acumulando ao longo das oito colheitas realizadas uma grande quantidade de nitrogênio na parte aérea (1^a e 2^a fase), houve um balanço muito positivo, mostrando dessa forma um grande ingresso de nitrogênio proveniente da atmosfera via FBN, o que explicaria o adequado crescimento da cultura neste solo extremamente pobre em N disponível. Estes dados confirmam o potencial para essas variedades que foram obtidos nos dois primeiros experimentos dessa tese, assim como os obtidos em outros estudos (Urquiaga *et al.*, 1989; 1992; Resende, 2000; Polidoro *et al.* 2000; Boddey *et al.*, 2001; Xavier, 2002). Os menores valores de balanço observados para a variedade Chunnee (16 kg ha⁻¹ de N), confirmam o baixo potencial para FBN dessa variedade, conforme apresentados por Urquiaga *et al.* (1989; 1992).

Este estudo corrobora com os resultados obtidos por Resende (2003) onde foi efetuado um balanço de N na cultura de cana-de-açúcar, após 16 anos de cultivo na Usina Cruangi em Timbaúba-PE, e observou-se que em geral a cultura de cana não reduziu significativamente o nível de N do solo, mostrando um balanço positivo

Os dados obtidos neste experimento mostram que, pela técnica de balanço de N, uma significativa quantidade de N entrou no sistema. Como as condições de estudo foram controladas, principalmente pelo uso do tanque de concreto, que restringiu o volume de solo explorado pelas plantas, essa entrada extra de N no sistema somente poderia ser creditada a FBN. Esperava-se que a técnica de diluição isotópica de ^{15}N evidenciasse o processo, o que não foi observado.

Problemas no uso das técnicas isotópicas com ^{15}N para avaliar a contribuição da FBN, são relatados na literatura (Boddey *et al.*, 1995), inclusive quando se estuda a contribuição da FBN em leguminosas (Ledgard *et al.*, 1985; Witty *et al.*, 1984). Para os resultados aqui encontrados, a explicação mais provável, é que a planta teste (cana-de-açúcar) deve ter explorado o N do solo diferentemente da planta testemunha, fugindo assim da premissa básica para aplicação dessa técnica. Também é possível que alterações na marcação do N do solo possam ter ocorrido ao longo do ano e as testemunhas não foram adequadas para refletir a marcação do N do solo utilizado pela cana.

Tabela 57 – Contribuição da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em 10 variedades de cana-de-açúcar estimado pelo balanço de N total no sistema solo-planta na profundidade de 0-20cm.

Cultivares de cana	Solo		Planta			Balanço de N 0-20cm**	FBN %
	Inicial	Final	N-Total Parte aérea				
			1ª fase	2ª fase	Total		
kg ha ⁻¹ de N							
SP 79-1011* / SP 79-2312	2336	2012 a	290 bcd	266 bc	556 cd	232 bcd	37 abc
SP 71-1406* / RB75-8540	2336	2057 a	316 bc	239 bc	555 cd	276 bcd	48 abc
SP 71-6163	2336	1998 a	454 a	309 bc	763 b	425 ab	55 ab
RB 72-454	2336	1968 a	463 a	291 bc	754 b	386 abc	52 ab
RB 73-9359* / RB83-5089	2336	2012 a	185 d	203 c	388 d	64 cd	16 bc
CB 45-3* / RB 82-5336	2336	2005 a	268 bcd	318 bc	586 bc	255 bcd	41 abc
SP 70-1143	2336	2035 a	463 a	482 a	945 a	644 a	67 a
RB 73 – 9735	2336	2086 a	371 ab	216 bc	587 bc	337 abcd	58 ab
KRAKATAU	2336	2123 a	346 b	329 b	675 bc	462 ab	67 a
CHUNNEE	2336	2057 a	230 cd	65 d	295 e	16 d	5 c
CV		5	12	17	14	41	40

Em cada coluna os valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de tukey ($p=0,05$).

*Variedades que foram substituídas na 2ª fase desse experimento, porém para realização desse balanço foi quantificado o N acumulado na parte aérea dessas variedades nas cinco primeiras colheitas, o que impossibilitou estimar a FBN exclusivamente em cada uma dessas variedades.

**Balanço de N-total do sistema = (N final do solo + N acumulado pela planta em 8 colheitas) – N inicial do solo.

5 CONCLUSÕES

* Os resultados de balanço de N-total do sistema solo-planta após 8 e 13 anos de cultivo foram positivos para a maioria das variedades estudadas, mostrando um significativo ingresso de nitrogênio proveniente da atmosfera via FBN para o sistema solo-planta.

*As variedades Krakatau, SP 70-1143, SP 79-2312 e SP 71-6163 confirmaram o potencial para FBN.

*As variedades RB 72-454, e RB 82-5336, RB 75-8540 e RB 83-5089 apresentaram alto potencial para FBN.

*Para as condições que foi realizado este estudo, o tipo de solo e o ciclo da cultura teve grande influência na contribuição da FBN.

* Os estudos que avaliam a contribuição da FBN pela técnica de abundância natural de ^{15}N e diluição isotópica de ^{15}N sempre deve ser feito com um estudo complementar, que visa estudar grau de uniformidade dos valores de abundância natural ^{15}N e de enriquecimento no perfil do solo, visando validar os resultados obtidos por estas técnicas, principalmente quando se trabalha com plantas testemunhas que exploram um volume de solo diferente da planta em que se está avaliando a contribuição da FBN.

*A FBN comportou-se como uma importante fonte de N ao sistema solo planta, e vislumbram a possibilidade de que com o manejo adequado (colheita de cana crua) e com a utilização de variedades eficientes para FBN, talvez, seja possível reduzir ou mesmo eliminar a adubação com fertilizantes nitrogenados na cultura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pelos resultados obtidos pode-se observar que a fixação biológica de nitrogênio é uma importante fonte de N para a cultura, principalmente quando as condições são mais adversas (soqueiras), no entanto é necessário a ampliação dos estudos com o objetivo de otimizá-la. Para tanto deve-se ter em mente que a quantificação da contribuição da fixação biológica de nitrogênio é de fundamental importância para potencializar e viabilizar novas formas de manejo. Esta quantificação permitirá então a tomada de decisões e o melhor planejamento agrícola, visando reduzir custos.

Na soja a contribuição desta fonte às plantas já é uma realidade e hoje, não se recomenda adubação nitrogenada nesta cultura. Na cana-de-açúcar, o mesmo vem sendo feito para cana planta, valendo ressaltar que a pesquisa vem evoluindo muito sobre os aspectos ecológicos, fisiológico, bioquímicos e genéticos, apontando para uma maior exploração e entendimento da FBN. Vale destacar que o programa de sequenciamento do genoma RIOGENE (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) e GENOPAR (*Herbaspirillum seropedicae*) mostram cada vez mais a importância da FBN no Brasil e devem permitir que o país continue na fronteira do conhecimento em relação ao processo de FBN em gramíneas.

Ao contrário do papel de cultura degradante do solo que sempre se pensou que a cultura de cana-de-açúcar tinha, o estudo apresentado demonstra que com o manejo adequado e, considerando, principalmente, as contribuições da FBN que fazem com que não ocorra uma redução dos níveis de nitrogênio do solo após vários anos de cultivo, a cana é um exemplo de sustentabilidade agrícola. No caso dos solos brasileiros que em sua maioria são deficientes em N-disponível, fica cada vez mais demonstrado o importante papel que a FBN tem exercido na nutrição nitrogenada desta cultura. Esta contribuição tem-se constituído na base para o balanço energético altamente positivo da cultura, proporcionando sua viabilidade técnica e econômica, com grandes perspectivas futuras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, B.J.R.; SANTOS, J.C.F. dos; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Metodos de determinacao do nitrogenio em solo e planta. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S., (Ed.). **Manual de metodos empregados em estudos de microbiologia agricola**. Brasilia: EMBRAPA-SPI, 1994. p.449-409. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).

ALVES B.J.R. **Aplicação da técnica de análise de solutos nitrogenados da seiva para a quantificação da fixação biológica de nitrogênio em *Desmodium ovalifolium* CV. Itabela**. Seropédica. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 150p. Tese de Doutorado, 1996.

ALVES, G.C.; SILVA, M.F.; FONSECA, W.C.; TEIXEIRA, K.R.S. **Procedimentos para isolamento de bactérias que expressam sistemas alternativos de nitrogenases: preparo de vidraria e meios de cultura**. Seropédica, novembro de 2004. (Embrapa Agrobiologia, Comunicado técnico, nº71).

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. **ASM News**, Washington, v.60, p.360-365, 1994.

AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA J.R. Nitrogênio em cana-planta - doses e fracionamento. **STAB**, Piracicaba, v.6, n.5, p.26-33, 1986.

BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V.L.D.; GOI, S.R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p. 911-922, 1997.

BALDANI, J.I.; REIS, V. M.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane – reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v.29, p.417-423, 2002.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; Inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.46, n. 3, p. 802-810, 1996.

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* (2005) 77(3): 549-579.

BEAUCHAMP, C.E. Influência del drenage sobre el rendimiento de azúcar de la caña. **Boletim Oficial de la Asociación de los técnicos azucareros del Cuba**, Havana, v.21, n.1, p.67-69, 1966.

BODDEY R.M.; DÖBEREINER J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. In: Current Developments. In: **SUBBA RAO, N.S., ed Biological Nitrogen Fixation**. New Delhi: Oxford, 1984, p. 277-313.

BODDEY, R.M. & VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with Brachiaria and Paspalum grasses using ¹⁵N-labelled organic matter and fertilizer. **Plant and Soil**, Dordrecht, 90: 265-292. 1986.

BODDEY R.M. (1987). Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **CRC Crit. Rev. Plant Sci**. 6:209-266.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J.. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.137, p.111-117, 1991.

BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. 1992. Calculations and assumptions involved in the use of the A-value and ¹⁵N isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N₂ fixation. **Plant and Soil**, 145:151-155.

BODDEY, R.M.; OLIVEIRA, O.C.de; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. 1994. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospecta for improvement. Paper to be presented at 15th World Congress of Soil Science, Acapulco. Mexico. Julho 10-16th.

BODDEY, R.M.; DE OLIVEIRA, O.C.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 195 – 209, 1995.

BODDEY, R.M.; POLIDORO, J.C.; RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Use of ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and others grasses. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.28, p.889-895, 2001.

BOHM, G.M. (1986). Impactos da poluição dos veículos automotores na saúde humana e meio ambiente. **FIESP/CIESP**, São Paulo.

BURRIS R.H. The acetylene reduction technique. In: Nitrogen fixation by free-living microorganisms. D.P.Stewart ed. International Biological Programme. V.6, p. 249-258. Cambridge Univ. Press., New York, 1975.

CABALLERO-MELLADO, J.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; REIS, V.M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. "Genetic structure of *Acetobacter diazotrophicus* populations and identification of a new genetically distant group." **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.3008-3013, 1995.

CAMPOS, D.V.B., de; RESENDE, A.S.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. 1995. Identification of wetland rice genotypes with potential for biological nitrogen fixation. Resumo expandido do International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: The role of biological nitrogen fixation. EMBRAPA-CNPAB, UFRRJ, Academia Brasileira de Ciências. Angra dos Reis, RJ. Novembro/Dezembro 1995. pp.242-243.

CANA-DE-AÇÚCAR (1997). Proálcool procura seu caminho para sobreviver. **A Granja**, Porto Alegre, v. 53, nº 581, p. 12-17.

CANUTO, E. L.; SALLES, J. F., OLIVEIRA, A.L.M.; PERIN, L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Respostas de plantas micropropagadas de cana-de-açúcar à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas. **Agronomia**, Seropédica, R.J., v.73, n.2, p.6-12, 2003.

CARNAÚBA, B.A.A. **Eficiência de utilização e efeito residual da uréia - ¹⁵N em cana-de-açúcar (*Saccharum spp*), em condições de campo**. 1989. 193p. Dissertação (Mestrado) - ESALQ/USP, Piracicaba.

CARNEIRO A.E.V.; TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L. Utilização da reserva orgânica e do nitrogênio do tolete de plantio (colmo-semente) no desenvolvimento da cana-planta. **Scientia Agrícola**, v.53, n.2, p.199-209, 1995.

CARUSO, L.V.; BALDANI, J.I. Monitoring the survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil using Lac-Z fusion. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis, R.J. **Abstracts...** Angra dos Reis, R.J. EMBRAPA-CNPAB/UFRRJ/ The Brazilian Academy of Sciences, 1995, p. 108-109.

CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N. Nitrogen mineralization affected by soil moisture, temperature, and depth. **Soil Science Society America Journal**, v.44, n.6, p.1233-1237, 1980.

CAVALCANTE V.A.; DÖBEREINER J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.23-31, 1988.

COJHO, E.H.; REIS, V.M.; SCHENBERG, A.C.G.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. **FEMS Microbiology**. Letters, Amsterdam, v.106, p. 341-346, 1993.

COMBE, M.L.; PONS, J.L.; SESBOUE, R.; MARTIN, J.P. Electrophoretic transfer from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: a new method to characterize multilocus enzyme genotypes of *Klebsiella* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.26-30, 1994.

CRUZ, L.M.; TEIXEIRA, K.R.S.; BALDANI, J.I. Expressão fenotípica de estirpes de *Acetobacter diazotrophicus* contendo o gene nif A de *Azotobacter vinelandii*. In: Reunião de Genética de Microrganismos, 20: 1995, Piracicaba, São Paulo. **Anais...** Piracicaba: SBG, 1995. p.116.

DIAS, F.L.F. **Relação entre produtividade, clima, solos e variedades de cana-de-açúcar, na Região Noroeste do Estado de São Paulo.** Piracicaba, 1997. 64p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

DÖBEREINER J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.19, p.251-258, 1959.

DÖBEREINER J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, p. 1-13, 1992.

DÖBEREINER J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.15, p.211-216, 1961.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.771–774. 1997.

DÖBEREINER, J.; RUSCHEL A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, São Paulo, v.1, p.261-272, 1958.

FARONI, C.E. **Sistema radicular de cana-de-açúcar e identificação de raízes metabolicamente ativas.** 2004. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J." *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico." **Plant and Soil**, Dordrecht, v.154, p.145-150, 1993.

GAVA, G.J.C.; TRIVELIN, P.C.; OLIVEIRA, M.W.; PENATTI, C.P. & VITTI, A.C. perdas de amônia proveniente da mistura de vinhaça e uréia aplicada ao solo coberto ou descoberto por palha de cana-de-açúcar. **STAB**, Piracicaba, v.19, p.40-42, 2001.

GOMES, J.F.F. **Produção de colmos e exportação de macronutrientes primários por cultivares de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)** 2003. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

IBGE - Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, **Sistema IBGE de recuperação automática - SIDRA**, 2005

JUNK G. & SVEC H.J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochim. Cosmochim. Acta.** 14: 234-243, 1958.

KENNEDY, I.R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, p.1229-1244, 2004.

KENNEDY, I.R.; ISLAM, N. The current and potential contribution of asymbiotic nitrogen fixation to nitrogen requirements on farms: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v.41, p.447–457, 2001.

LAL R. (2002). Soil carbon dynamics in cropland and rangeland. *Environmental Pollution* 116 – 353-362. Elsevier Science Ltda.

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 Experimental Agriculture**, Victoria, v.22, p.155-64, 1984.

LEDGARD, S.F.; SIMPSON, J.R.; FRENEY, J.R.; BERGERSEN, F.J. (1985) Field evaluation of ^{15}N techniques for estimating nitrogen fixation in legume-grass associations. *Australia Journal Agriculture Research* 36: 247-258.

LIMA, E.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.165-170, 1987.

MACEDO I.C. (1998) Greenhouse gas emissions and energy balances in Bio-Ethanol production and utilization in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, vol. 14., no 1, pp. 77-81.

MACEDO, I.C.; & KOLLER, H.W. (1997). Balanço de energia na produção de cana-de-açúcar e álcool nas usinas cooperadas em 1996. **International Report, Centro Tecnológico da Copersucar**, Piracicaba, 23p.

MACHADO, E.C. Fisiologia de produção de cana-de-açúcar, cultivo e utilização. In: PARANHOS, S.B. (Ed.). **Cana-de-açúcar**; cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 56-80.

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

MIRANDA, C.H.B.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Selection of ecotypes of *Panicum maximum* for associated biological nitrogen fixation using the ^{15}N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.657-663, 1990.

MORAES, V.A.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. 1997. Efeito da inoculação de *Acetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) variedade SP 70–1143, a partir da cultura de meristemas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19, 1997, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: SBM, 1997. Resumos n.26.

MORELLI, J.L.; NELLI, E.J. DEMATTÊ, J.L.I. Efeito do gesso e do calcário nas propriedades químicas de solos arenosos álicos e na produção de cana-de-açúcar. **Revista Stab – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v.6, p.24-31, 1987.

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

MUTHUKUMARASAMY, R.; REVATHI, G.; SESHADRI, S.; LAKSHMINARASIMHAN, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. **Current Science**, v.83, p.137-145, 2002.

NOGUEIRA, E.M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.P.; VARGAS, C.; DE PÁDUA, V.L.M.; DA SILVA, F.R.; DOS SANTOS, R.V.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G. and HEMERLY, A.S. 2001. Expression of sugar cane genes induced by inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genet. Mol. Biol.** 24: 199-206.

OLIVARES, F.L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. Híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. 1997. Tese (Doutorado) - UFRRJ, Seropédica, R.J.

OLIVARES, F.L.; REIS, V.M.; FAÇANHA, A.R. The role of endophytic diazotrops insugarcane root morphogenesis and development. In: Finam, T.M.; O' Brian, M.R.; Layzell, D.B.; Vessey, J.K. and Newton, W. (Eds), Nitrogen Fixation: Global perspectives, Oxon: CAB International, p.476-477.

OLIVEIRA, O.C. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz (*Oryza sativa*, L.) inundado**. 1994. Tese (mestrado) - UFRRJ, Seropédica, R.J.

OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.242, p.205–215, 2002.

ORLANDO-FILHO J., HAAG H.P.; ZAMBELLO Jr. E. Crescimento e absorção de macronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo. **Boletim Técnico Planalsucar**, Piracicaba, v.2, n.1, p.1-128, 1980.

ORLANDO FILHO, J. **Nutrição e adubação da cana de açúcar no Brasil**. Rio de Janeiro: IAA/PLANALSUCAR, 1983. 368p. (Coleção Planalsucar, 2).

PAULA, M.A. de; REIS, V.M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* and *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomea batata*), sugar cane (*Saccharum* spp.) and sweet sorghum (*Sorghum bicolor*). **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 11, p.111-115, 1991.

PEOPLES M.B., FAIZAH A.W., RERKASEM B. & HERRIDGE D.F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. **ACIAR**, Monograph No. 11, Canberra, 1989. 76p.

PICCOLO, M. C. ; NEILL, C. ; MELILLO, J. M. ; CERRI, C. C. ; STEUDLER, P. A. . 15N natural abundance in forest and pasture soil of the Brazilian Amazon basin. **Plant and Soil**, n. 182, p. 249-258, 1996.

PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.

POLIDORO, J.C. **O molibdênio na nutrição nitrogenada e na fixação biológica de nitrogênio atmosférico associada à cultura de cana-de-açúcar**. 2001. Tese (Doutorado) - UFRRJ, Seropédica, R.J.

REIS V. M.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, A. L. M.; REIS Jr, F. B.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Technical approaches to inoculate micropropagated sugarcane plants with *Acetobacter diazotrophicus*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.206, p.205–211, 1999.

REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; DOBEREINER, J. (2000) Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Reton, v.19, p.227-247.

REIS JÚNIOR, F.B. **Influência do genótipo da planta, micropropagação e fertilização nitrogenada sobre a população de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 1998. Dissertação (mestrado) - UFRRJ, Seropédica, R.J.

REIS JÚNIOR, F.B.; REIS, V.M., URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. "Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.)." **Plant and Soil**, Dordrecht, v.219, p.153-159, 2000.

RESENDE, A.S. **A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) como suporte da fertilidade nitrogenada dos solos e da produtividade da cultura de cana-de-açúcar: uso de adubos verdes**. 2000. 143f. Dissertação (mestrado) – UFRRJ, Seropédica – RJ.

RESENDE, A.S. **Efeito da queima e das aplicações de nitrogênio e vinhaça após 16 anos de cultivo de cana-de-açúcar**. 2003. 120f. Tese (doutorado) – UFRRJ, Seropédica – RJ.

RESENDE, A. S. de ; XAVIER, R. P. ; OLIVEIRA, O. C. de ; URQUIAGA, S. ; ALVES, B. J. R. ; BODDEY, R. M. . Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco. **Plant and Soil**, v. 281, p. 339-351, 2006.

RIDESA – Rede Interinstitucional para Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. Programa de Melhoramento Genético da cana-de-açúcar; Catálogo R.B. Campos dos Goytacazes-RJ, 46p., 2005.

RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E.; HENIS Y. Nitrogen fixation in sugar cane (*Saccharum officinarum*). In: GRANHALL, U. (Ed.). **Enviromental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria**. Uppsala: Ecological Bulletins, Swedish Natural, 1978. p. 297-305. (Ecological Bulletins/NFR, 26).

SALOMONE, I.G. de; DÖBEREINER, J. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p.193-196, 1996.

SEVILLA, M.; KENNEDY, C., Genetic analysis of nitrogen fixation and plant-growth stimulating properties of *Acetobacter diazotrophicus*, an endophyte of sugarcane. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.) , **Prokaryotic Nitrogen Fixation: a model system for the analysis of a biological process**. Wymondham, Horizon Scientific, 2000. p. 737–760.

SHEARER, G. & KOHL, D.H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Aust. J. Plant Physiol.**, 13, 699-756, 1986.

TEIXEIRA, K.R.S.; STEPHAN, M.P.; DOBEREINER, J. **Physiological studies of *Saccharobacter nitrocapta* a new acid tolerant N₂ fixing bacterium**. In: International Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes, Rio de Janeiro, 1987. p.149.

TRIVELIN, P.C.O.; VICTORIA, R.L.; RODRIGUÊS, J.C.S. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônio-15N e uréia-15N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.12, p.1375-1385, 1995.

TRIVELIN, P. C. O.; RODRIGUES, J. C. S.; VICTORIA, R. L. Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de início de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e uréia-15N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 89-99, 1996.

URQUIAGA, S.; BOTTEON, P.B.L.; BODDEY, R.M. Selection of sugar cane cultivars for associated biological nitrogen fixation using ¹⁵N-labelled soil. In: SKINNER, F. A.; BODDEY, R.M.; FENDRIK, I. **Nitrogen Fixation with Non-legumes**. Dordrecht, Kluwer, 1989. p. 311-319. (Developments in Plant and Soil Sciences, 35).

URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science and Society of America Journal**, v. 56, p.105-114, 1992.

URQUIAGA, S.; RESENDE, A. S. DE; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. A importância do molibdênio na fixação biológica de nitrogênio e na nutrição nitrogenada da cultura de cana-de-açúcar. **XIII Congresso Latino-Americano de Ciência do Solo**, Águas de Lindóia, SP. CD-ROM, 1996.

URQUIAGA S., RESENDE A. S., ALVES B.J.R., BODDEY R.M. & DÖBEREINER (1997). Fixação biológica de nitrogênio na cultura de cana-de-açúcar: Perspectivas. **Workshop sobre avaliação e manejo dos recursos naturais em áreas de exploração da cana-de-açúcar**. Aracajú, SE, EMBRAPA-CPATC, 11 a 13 de novembro, 126p.

URQUIAGA S., RESENDE, A.S. de; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Biological Nitrogen fixation as support for the sustainable production of sugar cane in Brazil: Perspectives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.71, n. 3, part. 2, p. 505-513, 1999.

VALLIS I., HAYDOCK K.P., ROSS P.J. & HENZELL E.F. (1967) Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pastures. III. The uptake of small additions of ¹⁵N-labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville lucerne. **Aust. J. Agric. Res.** 18: 865-877.

VARGAS, C. ; DE PÁDUA, V.L.M ; NOGUEIRA, E.M. ; VINAGRE, F. ; MASUDA, H.P. ; DA SILVA, F.R. ; BALDANI, J.I. ; FERREIRA, P.C.G. ; HEMERLY, A. . Signaling pathways mediating the association between sugarcane and endophytic diazotrophic bacteria: a genomic approach.. **Symbiosis**, 2003.

VASCONCELOS, A.C.M. **Comportamentos de clones IAC e variedades de cana-de-açúcar (Sacharrum spp.) nas condições edafoclimáticas da região do Vale do Paranapanema**. Jaboticabal, 1998. 108p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

VASCONCELOS, A.C.M.; GARCIA, J.C. Desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar. **Encarte de Informações Agronômicas**, nº 110, p.1-5. 2005.

WANI, S.P.; DART, P.J.; UPADHYAYA, M.N. Factors affecting nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) associated with sorghum and millet estimated using the soil core assay. **Canadian Journal of Microbiology**. v.29, p.1063-1069, 1983.

WEIER K.L. Nitrogenase activity associated with three tropical grasses growing in undisturbed soil cores. **Soil Biology and Biochemistry**, v.12, p.131-136, 1980.

WITTY, J.F.; RITZ, K. (1984) **Slow release ^{15}N fertilizer formulations to measure N_2 -fixation by isotope dilution**. *Soil Biology and Biochemistry* 16: 657-661.

WITTY J.F. & MINCHIN F.R (1988). **Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries**. In: Beck, D.P.& Materon L.A., ed. Nitrogen fixation by legumes in Mediterranean agriculture. Dordrecht, Netherlands. 331-344.

WITTY, J.F.; GILLER, K.E. Evaluation of errors in the measurement of biological nitrogen fixation using ^{15}N fertilizer. In IAEA/FAO, Stable Isotopes in plant nutrition, soil fertility and environmental studies. **International Atomic Energy Agency**, Vienna, p. 59-72, 1991.

XAVIER, R. P. **Adubação verde em cana-de-açúcar: influência na nutrição nitrogenada e na decomposição dos resíduos da colheita**. 2002. Dissertação (mestrado) – UFRRJ, Seropédica – RJ.

YONEYAMA, T.; MURAOKA, T.; KIM, T.H.; DACANAY, E.V. & NAKANISHI, Y. The natural ^{15}N abundance of sugarcane and neighbouring plants in Brazil, the Philippines and Miyako (Japan). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.189, v.239-244, 1997.

ZAVALIN, A.A; KANDAUROVA, T.M. & VINOGRADOVA, L.V. Influence of associative nitrogen/fixing microorganisms on the provision with nitrogen of summer wheat. In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE FIXATION DE L'AZOTE, 11th, INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 1997, PARIS. **Abstracts...** Paris: Institut Pasteur/INRA/CNRS/CEAORSTOM/CIRAD, 1997. p.72.