

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**ESTIMATIVA DO N DEPOSITADO NO SOLO PELA
SOJA UTILIZANDO A TÉCNICA DE MARCAÇÃO
FOLIAR COM UREIA OU GLUTAMINA
ENRIQUECIDAS COM ^{15}N**

Karla Emanuelle Campos Araujo

2018



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

**ESTIMATIVA DO N DEPOSITADO NO SOLO PELA SOJA
UTILIZANDO A TÉCNICA DE MARCAÇÃO FOLIAR COM UREIA OU
GLUTAMINA ENRIQUECIDAS COM ¹⁵N**

KARLA EMANUELLE CAMPOS ARAUJO

Sob a Orientação do Pesquisador
Segundo Sacramento Urquiaga Caballero

Co-orientação do Pesquisador
Robert Michael Boddey

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora, em
Fitotecnia**, no Curso de Pós-graduação
em Fitotecnia.

Seropédica, R J
Agosto de 2018

A663e

Araujo, Karla Emanuelle Campos, 1982-

Estimativa do N depositado no solo pela soja utilizando a técnica de marcação foliar com ureia ou glutamina enriquecidas com ^{15}N / Karla Emanuelle Campos Araujo. - 2018.

58 f.

Orientador: Segundo Sacramento Urquiaga Caballero.

Coorientador: Robert Michael Boddey.

Tese (Doutorado). - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-graduação em Fitotecnia, 2018.

1. Diluição isotópica do ^{15}N . 2. Marcação foliar com ^{15}N .

3. FBN. 4. ^{15}N -Ureia . 5. ^{15}N - glutamina.

I. Urquiaga Caballero, Segundo Sacramento , 1950-, orient.

II. Boddey, Robert Michael, 1948-, coorient.

III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Cursos de Pós-graduação em Fitotecnia. IV. Título.

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

KARLA EMANUELLE CAMPOS ARAUJO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção de grau de **Doutora em Fitotecnia** no curso de Pós-graduação em Fitotecnia, área de concentração em Agroecologia.

TESE APROVADA EM 24/08/2018

Robert Michael Boddey. Ph. D. Embrapa Agrobiologia
(Co-orientador)

Jorge Jacob Neto. Dr. UFRRJ

Nivaldo Schultz. Dr. UFRRJ

Márcio dos Reis Martins. Dr. Embrapa Agrobiologia

Cláudia Pozzi Jantalia. Dra. Embrapa Agrobiologia

Segundo Urquiaga. Dr. Embrapa Agrobiologia
Orientador

DEDICATÓRIA

*A minha mãe, minha fortaleza, meu amor maior e a
minha vida. Te amo, minha luz!*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus.

À minha mãe, por toda confiança, paciência e por todo amor dado a mim, em todos os momentos.

Aos meus irmãos Tália, Tadeu, Kátia e Jane por serem sempre tão companheiros e me ampararem nas horas mais difíceis.

À Carlos Vergara, pela dedicação, compressão, amor, paciência e ajuda em todas as etapas deste trabalho e na vida.

As minhas amigas e companheiras de jornada durante o doutorado, Mara Alexandre, Alessandra Machado e Thamara Mendonça.

Aos meus amigos de sempre e longa data, Ricardo, Samuel, Michelle, Júlia, Margarida, Fabiana, Cláudia, Claudizângela, Alessandra e Thamara. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos amigos do laboratório de Ciclagem de Nutrientes, Ana, Ricardo, Selenobaldo, Márcio, Selmo, Lucero, Wadson, Isabel por toda ajuda e boa convivência.

Aos analistas da EMBRAPA Agrobiologia, Andréia Loviane e ao Renato Moutinho, pela a realização das análises realizadas nas plantas.

Aos técnicos da EMBRAPA Agrobiologia, Roberto Grégio, Ednelson e Altiberto pela realização das análise das plantas.

Aos funcionários da EMBRAPA Agrobiologia, Roberto Carlos, Alderi, Claudinho, Naldo, Ernani, Nivaldo, Aurélio, Arley pela amizade, paciência e participação na condução do experimento.

Ao Robert Boddey, por todos os ensinamentos, orientação, disponibilidade e principalmente pela paciência.

Ao Bruno Alves, por seus ensinamentos, orientação, colaboração, e apoio nos trabalhos realizados.

Ao Segundo Urquiaga pelo incentivo e por permitir desenvolver o treinamento científico sob sua orientação.

Aos doutores Jorge Jacob, Nivaldo Schultz, Márcio Martins e Cláudia Pozzi pela participação na banca de defesa da tese.

À Embrapa Agrobiologia e Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela capacitação e formação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO GERAL

ARAÚJO, Karla Emanuelle Campos. **Estimativa do N depositado no solo pela soja utilizando a técnica de marcação foliar com ureia ou glutamina enriquecidas com ^{15}N** . 2018. 58p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o uso de uma técnica isotópica de N (marcação das folhas com ^{15}N) para estimar o N total depositado no solo pelo sistema radicular da soja.

O experimento foi conduzido em vasos de 6 kg de solo em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com esquema de parcelas subdivididas, com cinco repetições. Os tratamentos consistiram em marcação foliar, com ^{15}N , usando duas fontes de N, sendo ^{15}N -Ureia e ^{15}N - glutamina, e seis épocas de coleta, que foram realizadas aos 2, 7, 14, 25, 47 e 70 dias após a marcação com o isótopo ^{15}N , correspondendo aos estádios V₄, R₁, R₃, R₅, R₆ e R₇, respectivamente. Foi determinado o enriquecimento de ^{15}N no tecido da planta em cada coleta e o nitrogênio nas raízes não recuperadas-NRNR (no solo rizosférico e no solo total dos vasos). De 14 até 47 dias após marcação (DAM), as raízes marcadas com glutamina continuaram uniformes em enriquecimento de ^{15}N . Em contraste, as raízes marcadas com ureia apresentaram diferenças significativas entre elas. Para as coletas realizadas aos 2, 7, 10 DAM o enriquecimento de ^{15}N dos diferentes segmentos da parte aérea das plantas mostraram que não houve uniformidade na marcação entre diferentes partes da planta. No geral, observa-se que as plantas marcadas com glutamina apresentaram uma distribuição de marcação mais lenta, ao longo do crescimento. Quanto as contribuições do NRNR (mg planta⁻¹), observou-se que aos 2 DAM das plantas houve uma grande exsudação do N, de 163 mg e 141 mg planta⁻¹, para os tratamentos de ureia e glutamina, respectivamente. As estimativas da NRNR a partir de 10 DAM não diferem estatisticamente entre as plantas marcadas com ureia ou glutamina marcadas. A partir dos 10 DAM praticamente não observou diferenças nas estimativas de NRNR entre as duas fontes de marcação das plantas. Quando o NRNR foi calculado em função do N total da planta inteira, a partir de 10 DAM o NRNR se manteve uniforme, variando de 8 a 15% para as duas fontes de marcação. Neste estudo, mostramos que inicialmente (até 2 DAM) houve uma exsudação do N enriquecido e imediatamente depois, até 10 DAM, uma grande parte deste N foi reabsorvido. A partir desta data o aumento do N enriquecido no solo deve representar N derivado da senescência e exsudação do N semelhante em plantas não tratadas com N enriquecido.

Palavras chaves: Diluição isotópica do ^{15}N , Marcação foliar com ^{15}N , FBN, ^{15}N -Ureia e ^{15}N - glutamina.

GENERAL ABSTRACT

ARAÚJO, Karla Emanuelle Campos. **Estimation of the N deposited in the soil by soybean using leaf labelling with ^{15}N urea or glutamine.** 2018. 58p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

The objective of this study was to evaluate the use of an N isotope technique (^{15}N -leaf labelling) to estimate the total N deposited in the soil by the soybean root system. The experiment was conducted in pots of 6 kg soil in a greenhouse at Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. The experiment was arranged in a randomized complete block design with five replicate blocks. The treatments consisted of ^{15}N -leaf-labelling using two N sources, ^{15}N -Urea or ^{15}N -glutamine, six harvests which were performed at 2, 7, 14, 25, 47 and 70 days after labelling with the isotope ^{15}N , corresponding to the stages V4, R1, R3, R5, R6 and R7, respectively. The enrichment of ^{15}N in the tissues of the plant at each harvest and the N in the unrecovered roots (non-recoverable root nitrogen – NRRN) in the rhizospheric soil and in the total soil of the vessels were determined. For both the urea and glutamine labelled plants the ^{15}N enrichment data of the different root cohorts (primary, secondary and fine roots) showed uniformity at 10 and 14 days after the ^{15}N -labelling of the leaves. From 14 to 47 DAL, the glutamine-labelled roots remained uniform in ^{15}N enrichment. In contrast, the roots labelled with urea presented significant differences between cohorts. For the harvests performed at 2, 7, 10 DAL, the enrichment of ^{15}N of the different segments of the aerial part of the plants showed that there was no uniformity in the labelling of different parts of the plant. In general, glutamine-labeled plants were shown to have a slower migration of the ^{15}N enrichment during growth. As for the NRRN (mg plant^{-1}), it was observed that at 2 DAL there was a large exudation of the N, of 163 mg and 141 mg plant^{-1} for the urea and glutamine treatments, respectively. Estimates of NRRN from 10 DAL did not differ statistically between the urea- or glutamine-labelled plants. From the 10 DAL onwards, practically no differences in NRRN estimates were observed between the two sources of plant labelling. When the NRRN was calculated as a function of the total N of the whole plant, from 10 DAL onwards the NRRN remained relatively uniform, varying from 8 to 15% for the two labelling sources. In this study, we showed that initially (up to 2 DAL) there was exudation of enriched N and immediately after, up to 10 DAL, a large part of this N was reabsorbed. From this date onwards, the increase of the enriched N in the soil should represent N derived from senescence and exudation, in the same manner as N in plants not treated with enriched N.

Keywords: ^{15}N isotope dilution, ^{15}N leaf labelling, BNF, Urea- ^{15}N e glutamine- ^{15}N .

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos estádios vegetativos e reprodutivos da soja.....	6
Tabela 2. Descrição da subdivisão do estádio R5 da soja.	7
Tabela 3. Relação das macrorregiões, regiões fisiográficas e regiões edafoclimáticas de adaptabilidade das cultivares de soja.	9
Tabela 4. Contribuição da FBN em leguminosas de grão.	11
Tabela 5. Relação do N derivado das raízes não recuperadas (NRNR) de leguminosas em relação ao N total acumulado pela planta.....	21
Tabela 6. Enriquecimento com ^{15}N (% átomos ^{15}N excesso) e ^{15}N no solo rizosférico e solo total ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso vaso^{-1}), marcados com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.....	37
Tabela 7. Átomos % ^{15}N excesso e ^{15}N Planta ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta^{-1}) em diferentes partes da parte aérea de soja, marcadas com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.....	39
Tabela 8. Enriquecimento com ^{15}N (% átomos ^{15}N excesso) e a quantidade de ^{15}N em excesso ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta^{-1}) em diferentes partes da parte aérea de soja, marcadas com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.	41
Tabela 9. Enriquecimento com ^{15}N (% átomos ^{15}N excesso) e a quantidade de ^{15}N em excesso ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta^{-1}) na parte aérea de soja, marcadas com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.....	42
Tabela 10. Estimativas do N das raízes não recuperável (NRNR) no solo rizosférico e no solo.	43
Tabela 11. Estimativas do total N das raízes não recuperável (NRNR) no solo rizosférico e no solo em mg N planta^{-1} e como porcentagem do N total da planta.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura do complexo MoFe e Fe proteína da nitrogenase e fluxo de elétrons entre as duas enzimas (LONG et al., 2015). 12
- Figura 2.** Coloração interna rósea de um nódulo ativo, pela presença da leg-hemoglobina. 13
- Figura 3.** Etapas para corte da folha: **(a)** Corte da folha com bisturi; **(b)** imersão da folha na solução ^{15}N ; **(c)** folha imersa na solução enriquecida com ^{15}N ; **(d)** cobertura do microtubo. 24
- Figura 4.** Visão geral do experimento. Solo coberto com papel alumínio. 25
- Figura 5.** Raiz de soja da primeira coleta (dois dias após marcação). **(a)** Raiz Principal; **(b)** Raízes Secundárias; **(c-d)** Raízes Finas. 26
- Figura 6.** Acúmulo de massa seca por diferentes tecidos de plantas de soja marcadas via foliar com ureia ou glutamina, em seis épocas de coleta. **(a)** nódulo; **(b)** raiz; **(c)** parte aérea; **(d)** planta inteira. 29
- Figura 7.** N acumulado por diferentes tecidos de plantas de soja, marcadas via foliar com ureia ou glutamina, em seis épocas de coleta. **(a)** nódulo; **(b)** raiz; **(c)** parte aérea; **(d)** planta inteira. 30
- Figura 8.** Acúmulo de massa seca por diferentes tecidos da planta de soja e solo rizosférico. **(a)** marcação foliar com ureia; **(b)** marcação foliar com glutamina. ... 31
- Figura 9.** N total acumulado por diferentes tecidos de plantas de soja e solo rizosférico. **(a)** marcação foliar com ureia; **(b)** marcação foliar com glutamina. 32
- Figura 10.** Enriquecimento de ^{15}N em excesso de **(a)** raízes primárias, **(b)** secundárias e **(c)** finas durante as 6 coletas de dias 2, 7, 10, 14, 47 e 70 dias após de marcação da folha com ureia ou glutamina..... 34
- Figura 11.** Total ^{15}N em excesso (mg por planta) recuperado pelas **(a)** raízes primárias, **(b)** secundárias e **(c)** finas durante as 6 coletas de dias 2, 7, 10, 14, 47 e 70 dias após de marcação da folha com ureia ou glutamina..... 36

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1	Características Gerais da Cultura da Soja.....	4
2.2	Características Fenotípicas das Plantas de Soja.....	4
2.3	Fases Fenológicas da Planta de Soja.....	4
2.4	Influência do Fotoperíodo e da Temperatura no Ciclo da Planta de Soja	7
2.5	Grupo de Maturidade Relativa (GMR).....	8
2.6	Indicação de Cultivares por Regiões Edafoclimáticas.....	8
2.7	Fixação Biológica de Nitrogênio	10
2.8	Contribuições da FBN Para a Cultura da Soja.....	13
2.9	Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas.....	14
2.10	Técnicas Isotópicas	15
2.11	Técnica de $^{15}\text{N}_2$	15
2.12	Diluição Isotópica	16
2.13	Abundância Natural de ^{15}N	17
2.14	Nitrogênio do Solo Derivado do Sistema Radicular da Planta.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Condução do Experimento.....	23
3.2	Coleta do Experimento	25
3.3	Processamento de Amostras e Cálculos de $\text{mg } ^{15}\text{N}$ por Planta e NRNR.....	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Acúmulo de Massa Seca e Nitrogênio Total em Plantas de Soja	28
4.2	Diluição do ^{15}N nas Raízes de Soja em Crescimento	33
4.3	Diluição do ^{15}N nas Folhas de Soja em Crescimento	37
4.4	Nitrogênio nas Raízes Não Recuperado (NRNR).....	42
5	CONCLUSÃO	46
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
7	APÊNDICE	58

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é o produto agrícola mais importante em termos quantitativos na agricultura brasileira, sendo Brasil o maior exportador deste grão no mundo. No ano agrícola de 2017/18 esta cultura ocupou 35 milhões de hectares (Mha) produzindo um total de 118 milhões de toneladas (114 Tg) de grão, com rendimento médio de 3370 kg grão ha⁻¹ (IBGE-LSPA, 2019). O grão de soja tem aproximadamente 40 % de proteína (~6,5 % N) e por isso é muito valorizado integrando a maioria das rações para animais, seja no Brasil ou no exterior. O N acumulado no grão vem principalmente do processo da fixação biológica do N₂ do ar (FBN). Estima-se que aproximadamente 80 % do N na cultura da soja é derivado da FBN (HUNGRIA et al., 2006a; ZOTARELLI et al., 2012) e esta proporção é aproximadamente igual a proporção do N na parte aérea encontrada no grão (ALVES et al., 2003). Em outras palavras, a quantidade do N colhida no grão é exportada do campo (para o Brasil um total de aproximadamente 7,4 Tg, ou 188 kg N ha⁻¹) e mais ou menos igual o total do N derivado da FBN. O problema com esta afirmação é que não conta o N nas raízes presentes na hora da colheita final. Na fase final do ciclo as raízes estão mortas e uma proporção desconhecida delas, e seu conteúdo do N, já foi depositado no solo. Com isso, não sabemos a contribuição residual que: 1) pode beneficiar a cultura subsequente ou 2) se for imobilizado é “sequestro de carbono”.

Apesar da elevada capacidade fixadora de N₂ desta cultura, ainda não existe um consenso sobre o balanço de N do solo cultivado com a cultura da soja, uma vez que a real contribuição da FBN para a cultura envolve o conhecimento do total de N acumulado pela planta. Enquanto a quantificação do total do N acumulado na parte aérea da soja pode ser feita de forma bastante simples, existe uma grande dúvida em relação ao total de N acumulado em seu sistema radicular. Tradicionalmente, a acumulação de N em raízes tem sido estimada através de amostragem direta, seguindo etapas de escavação e peneiramento (BERGERSEN et al., 1992; ALVES et al., 2002). Seguindo esta técnica, Peoples et al. (1995) e Zotarelli, (2000) mostraram que a exportação de N nos grãos de culturas, como a soja, pode superar o total de N derivado da FBN acumulado pela planta e levar a balanços de N negativos para o solo, mas outros estudos mostram o contrário (ALVES et al., 2006).

Em solos com alto conteúdo de matéria orgânica (MOS) e de N mineral, a proporção de N fixado pela leguminosa é menor, sem afetar o rendimento da cultura, e nesta situação é provável que a alta exportação do N do sistema com os grãos da soja resultaria num balanço negativo do N do solo causado pela cultura. Entretanto, a maior parte da área plantada com soja no Brasil está em Latossolos ou solos arenosos que frequentemente mostram baixa disponibilidade de N mineral durante o ciclo da soja. Esta questão do balanço de N é de grande importância para a avaliação da sustentabilidade de rotações de culturas. Se durante o desenvolvimento da cultura da soja ocorre exsudação de N para o solo e nos estágios finais do ciclo da cultura o N é depositado no solo em raízes senescentes ou mortas, a avaliação do N derivado da soja que permanece no solo utilizando a simples escavação e peneiramento do solo resultaria numa subestimativa desta contribuição do N da planta da soja.

Russel e Fillery (1996) propuseram uma técnica utilizando a marcação das plantas com material enriquecido com o isótopo ¹⁵N, para avaliar o N derivado das raízes normalmente não recuperável do solo (denominado “N de raiz não recuperável” – NRNR) devido à decomposição dos tecidos radiculares antes a colheita final da cultura. Estes autores trabalharam com a cultura de tremoço (*Lupinus angustifolius*) e subsequentemente outros membros da mesma equipe (McNEILL et al., 1997)

trabalharam com trevo (*Trifolium subterraneum*) e serradela (*Ornithopus compressus*). Desde estes trabalhos pioneiros a técnica foi adotada por várias equipes, principalmente na Austrália e Europa (WICHERN et al., 2008), mas somente um estudo foi feito (na Austrália) com a cultura de soja (ROCHESTER et al., 1998). Neste trabalho os autores não mostraram os resultados detalhados, como o enriquecimento de ^{15}N das raízes, da parte aérea ou do solo, mas concluíram que 38 % do N total na soja (acúmulo do N na parte aérea foi estimado em 430 kg N ha^{-1}) foi encontrado nas raízes e no NRNR. Como esta estimativa parece extremamente alta e o estudo foi feito em condições edafoclimáticas muito diferente daquelas nas áreas dedicadas a soja no Brasil, se faz necessário conduzir estudos de validação desta técnica e aplicar na cultura de soja em condições de campo no Brasil.

Na técnica desenvolvida por Russel e Fillery (1996), é necessário enriquecer o N na planta com o isótopo ^{15}N . Várias técnicas foram testadas por estes autores e outros (McNEILL et al., 1997; KHAN et al., 2002a) incluindo a absorção de ureia altamente marcada com ^{15}N por folhas cortadas da planta (“leaf-flap feeding”) ou por pecíolos cortados ou por absorção via barbante de algodão (“cotton wicks”) inserido num furo no caule da leguminosa. Wichern et al. (2008) discutiram as vantagens e desvantagens destas e outras técnicas e concluíram que provavelmente a técnica de alimentar folhas cortadas com ureia marcada com ^{15}N seja a mais conveniente.

Para aplicar a técnica é necessário marcar as plantas de 25 a 40 dias após o plantio e fazer uma colheita quase no final do ciclo de crescimento. A suposição feita é que o enriquecimento de ^{15}N do N nas raízes finas representa a marcação de ^{15}N do N perdido pela planta ao solo. Para calcular o N total derivado da planta depositado no solo (N derivado das raízes não recuperável - ‘NRNR’) o total do ^{15}N em excesso ($^{15}\text{N}_{\text{solo}}$) que é calculado a partir da massa seca, concentração de N e o enriquecimento de ^{15}N do solo (o enriquecimento de ^{15}N acima do valor da abundância natural no solo em um tratamento controle – plantas não marcadas com ^{15}N). Utilizando este valor como referência, o NRNR é obtido da seguinte relação:

$$\text{NRNR} = \frac{^{15}\text{N}_{\text{solo}}}{^{15}\text{N}_{\text{RR-N/g}}}$$

Onde:

$^{15}\text{N}_{\text{RR-N/g}}$ é a quantidade de ^{15}N em excesso em cada grama de N das raízes recuperadas (derivado direto da % ^{15}N em excesso [ou abundância de ^{15}N em ‰] do N das raízes finas). Esta técnica é baseada nas suposições que: I. a relação isotópica do N no solo derivado das raízes é igual à mesma relação nas raízes, II. a relação isotópica do N das raízes é constante com o tempo e III. na distribuição espacial (JANZEN and BRUINSMA, 1989; SAWATSKY & SOPER, 1991; JENSEN, 1996). A validade destas suposições e outras foram considerados em detalhes no estudo de Gasser et al. (2015), mas a leguminosa estudada por estes autores foi a forrageira perene, trevo (*Trifolium pratense*).

Em estudos preliminares com a soja há alguns anos (PAREDES et al., 2008), o grupo de Ciclagem de nutrientes na Embrapa-Agrobiologia descobriu que o enriquecimento de ^{15}N de raízes secundárias e finas mudou com o tempo e também, de acordo com os resultados de Gasser et al. (2015), houve um enriquecimento do solo com ^{15}N num curto período de tempo logo depois a marcação de folhas com ^{15}N e, subsequentemente, somente menores aumentos. Este último resultado sugere que a aplicação da ureia marcada está provocando rápida exsudação de N marcado, e as altas quantidades de NRNR estimadas pode ser em grande parte um artefato desta aplicação da ureia na folha.

Este estudo teve como objetivo geral usar a técnica isotópica (marcação das folhas com ^{15}N) para estimar o N total depositado no solo pelo sistema radicular da soja; e como objetivos específicos:

- a) Avaliar a distribuição do isótopo ^{15}N em partes da planta ao longo do tempo após marcação foliar;
- b) Avaliar a distribuição do isótopo ^{15}N em diferentes frações do sistema radicular da soja e sua variação ao longo do tempo, após a marcação da planta através das folhas;
- c) Quantificar o total de N contido nas raízes, incluindo as não recuperadas, pelo método peneiramento e a participação do N solúvel nas estimativas de acumulação de N pelo sistema radicular da soja, usando ^{15}N ;
- d) Avaliar a contribuição dos exsudados das folhas sobre a estimativa do total de N acumulado no sistema radicular da soja, através do emprego da técnica isotópica com ^{15}N .

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características Gerais da Cultura da Soja

A soja tem uma grande diversidade genética e fenotípica, isso se deve ao grande número de cultivares existentes, provenientes de muito investimento em pesquisa, buscando aumentar a produtividade da cultura e a resistência da planta a pragas e doenças. Diversos programas de melhoramento são voltados para a cultura da soja. Com isso, a soja hoje é uma das culturas mais estudadas no país, sendo ainda a mais cultivada.

A fenologia das plantas está relacionada às fases de desenvolvimento, e permite compreender a relação entre as características fenotípicas e fisiológicas da planta.

As fases de desenvolvimento das plantas de soja podem ser divididas em duas, a vegetativa, que compreende o período da sementeira até o florescimento e a fase reprodutiva, que vai do florescimento até a colheita (BERGAMIN et al, 1999). O início do ciclo da cultura é com a emergência da plântula, e o seu ciclo é finalizado com o amadurecimento das vagens. O ciclo das cultivares indicadas para o cultivo no Brasil varia entre 90 a 148 dias, e são controlados por condições edafoclimáticas e pelo genótipo das cultivares (PEIXOTO, 2000), embora hoje haja preferência por cultivares de ciclo mais curto.

2.2 Características Fenotípicas das Plantas de Soja

As cultivares de soja apresentam características genéticas variadas. Com isso as características fenotípicas também irão variar, já que é em função do genótipo da planta.

As diferentes cultivares podem apresentar flores brancas ou roxas; cor da pubescência variando entre cinza, marrom, marrom-claro e marrom médio; cor do hilo varia em preto, marrom e marrom-claro; altura da planta variando de 30 a 200 cm, sendo a altura ideal entre 60 a 110 cm. As cultivares de soja apresentam hábitos de crescimento determinado, semideterminado e indeterminado. A grande maioria das cultivares brasileiras de soja apresentam o tipo de crescimento determinado, que é caracterizado por possuir racemos florais terminais com crescimento vegetativo que quase cessa após o florescimento, aumentando muito pouco em altura (NOGUEIRA et al., 2009). Nos últimos anos o cultivo de cultivares de soja com crescimento indeterminado tem aumentado significativamente. Este tipo de cultivares, caracteriza-se por não apresentar racemo floral terminal, sendo que nestas a gema apical mantém o crescimento vegetativo após início do florescimento, com isso continuam a incrementar altura até o final do florescimento. Poucas cultivares comerciais apresentam o tipo de hábito de crescimento semideterminado (SD), que se caracteriza por possuir racemo floral terminal, atingindo 70% da altura final ao florescer (NOGUEIRA et al., 2009).

2.3 Fases Fenológicas da Planta de Soja

As fases de desenvolvimento são divididas em vegetativas e reprodutivas. O período vegetativo é compreendido pelo desenvolvimento das folhas, dos ramos, dos nós do caule e das gemas. É nesse período que ocorre o desenvolvimento do aparato fotossintético, o período reprodutivo, compreende o florescimento, desenvolvimento das vagens, enchimento de grãos e maturação (SEDIYAMA, 2009).

A metodologia de descrição dos estádios de desenvolvimento da planta de soja universalmente aplicado é a proposta por Feshr & Caviness (1977), esta divide o desenvolvimento da planta em duas fases: vegetativa (V) e reprodutiva (R) (Tabela 1).

Na fase vegetativa, considera-se como primeiro nó aquele das folhas unifolioladas (V1). Os demais nós, são contados logo depois de se desenrolar sua folha

trifoliolada completamente (V2, V3, V4...Vn). O estágio de emergência (VE) e estágio de cotilédone (VC) antecedem o estágio V1, respectivamente.

Os estádios reprodutivos são divididos em quatro fases distintas, são elas: o florescimento (R1 e R2), desenvolvimento da vagem (R3 e R4), desenvolvimento do grão (R5 e R6) e maturação da planta (R7 e R8).

Tabela 1. Descrição dos estádios vegetativos e reprodutivos da soja.

Estádio	Denominação	Descrição
VE	Emergência	Cotilédones acima da superfície do solo.
VC	Cotilédone	Cotilédones completamente abertos.
V1	Primeiro nó	Folha unifoliadas completamente desenvolvidas.
V2	Segundo nó	Primeira folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V3	Terceiro nó	Segunda folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V4	Quarto nó	Terceira folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V5	Quinto nó	Quarta folha trifoliolada completamente desenvolvida.
V6	Sexto nó	Quinta folha trifoliolada completamente desenvolvida.
Vn	Enésimo nó	Ante-enésima folha trifoliolada completamente desenvolvida.
R1	Início do florescimento	Uma flor aberta em qualquer nó.
R2	Florescimento pleno	Uma flor aberta num dos dois últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida.
R3	Início formação de vagem	Vagem com 5mm de comprimento num dos quatro últimos nós do caule com folha completamente desenvolvida.
R4	Vagem completamente desenvolvida	Vagem com 2,0 cm de comprimento num dos quatro últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida.
R5	Início enchimento do grão	Grão com 3 mm de comprimento em vagem, num dos quatro últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida.
R6	Grão cheio	Vagem contendo semente verde que preencha a sua cavidade de um dos quatro últimos nós do caule, com folha completamente desenvolvida.
R7	Início da maturação	Uma vagem normal no caule com coloração de madura.
R8	Maturação completa	95% das vagens com coloração de madura.

Fonte: FEHR & CAVINESS (1977).

Ritchie et al. (1977) propôs a subdivisão do estádio R5, em 5 sub estádios, como pode ser visto na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição da subdivisão do estádio R5 da soja.

Estádio	Descrição
R5.1	Granação de 10% (grãos perceptíveis ao tato)
R5.2	Granação de 11 – 25%
R5.3	Granação de 26 – 50%
R5.4	Granação de 51 – 75%
R5.5	Granação de 76 – 100%

Fonte: RITCHIE et al. (1977).

O ciclo da cultura inicia-se com a emergência da plântula e completa seu ciclo com a maturação das vagens, com uma variação de aproximadamente 70 a 200 dias, podendo ser super-precoce (90 a 110 dias), precoces (até 115 dias), médios (125 a 135 dias) e tardios (acima de 135 dias) (SEDIYAMA, 2009). A maioria das cultivares adaptadas às condições do Brasil apresenta um ciclo em torno de 90 a 150 dias (SEDIYAMA, 2009). A duração das fases e do ciclo de desenvolvimento é controlada pelas condições edafoclimáticas (KANTOLIC, 2008), e varia com o genótipo (SETIYONO et al., 2007).

2.4 Influência do Fotoperíodo e da Temperatura no Ciclo da Planta de Soja

Os fatores abióticos que mais influenciam o desenvolvimento e a adaptação das diferentes cultivares de soja a determinadas regiões, são: água, temperatura e fotoperíodo. Dentre esses fatores, deve-se destacar o fotoperíodo, já que a planta de soja é sensível ao mesmo. O fotoperíodo crítico, irá variar de acordo com a cultivar, se este período estiver acima, a planta continuará vegetando, atrasando assim o florescimento, por esta razão a soja é considerada planta de dias curtos (FARIAS et al., 2007). Devido à sensibilidade da soja ao fotoperíodo, a adaptabilidade de cada cultivar varia à medida que se desloca o seu cultivo em direção ao sul ou ao norte, ou seja, quando varia a latitude (CARNEIRO et al., 2014). Para que a soja pudesse ser produzida em diferentes regiões do país, como no centro-oeste brasileiro, foram desenvolvidas cultivares de período juvenil longo, permitindo que elas só floresçam quando já tiverem um bom crescimento vegetativo (HARADA, 2006; CORREIA, 2008).

A exigência por um determinado fotoperíodo pode ser modificada pela temperatura, principalmente noturna. As baixas temperaturas retardam o florescimento, possivelmente interferindo no fotoperíodo. Devido a isso, uma mesma cultivar pode ter ciclo vegetativo variável de ano para ano no mesmo local, na mesma latitude. Exemplo disso, é um estudo desenvolvido em Passo Fundo, onde plantou-se uma cultivar de soja de ciclo médio, em cinco épocas diferentes, entre os meses de setembro a janeiro, em dois anos. No primeiro ano, nas cinco épocas de plantio, o período da emergência ao pleno florescimento foi mais longo, quando comparado ao segundo ano de cultivo, que nas cinco épocas de plantio apresentou uma redução no número de dias nessa fase (da emergência ao pleno florescimento) (MUNDSTOK & THOMAS, 2005). As diferenças de data de floração entre cultivares, numa mesma época de semeadura e na mesma latitude, são devido às variações de temperatura ou umidade. A precocidade no florescimento poderá ocorrer, devido a temperaturas mais elevadas, podendo acarretar

diminuição na altura de planta. Podendo ainda se agravar, se simultaneamente houver déficit hídrico e/ou fotoperiódica durante a fase de crescimento (EMBRAPA, 2013).

2.5 Grupo de Maturidade Relativa (GMR)

A classificação das cultivares de soja é feita por grupos de maturação, devido ao fotoperíodo, as cultivares são recomendadas para determinadas faixas de latitude. O sistema de classificação de soja por grupos de maturação varia de 0 a 10, ou seja, isso significa que quanto maior é o seu número, mais próximo da linha do Equador é sua região de adaptação, sendo no Brasil os grupos indicados com variação de 5.0 a 10 (PENARIOL, 2000). Por exemplo, uma cultivar de GMR 7.8 tem um ciclo maior que uma 7.6. De maneira geral, para cada aumento de número depois do ponto teremos de 1,5 a 2 dias a mais de ciclo. Cada grupo de maturação se ajusta melhor em determinada faixa de latitude, em função de sua resposta ao fotoperíodo, variando de acordo com a quantidade de horas de luz a que é exposta (CARNEIRO et al., 2014). Quanto menor a quantidade de luz que a planta de soja recebe, mais rapidamente entrará na fase reprodutiva, seu ciclo é encurtando e a altura das plantas é reduzida (HALL, 2001).

Existem algumas exceções, as cultivares de hábito de crescimento indeterminado, possuem uma grande amplitude de cultivo, já que ao mesmo tempo apresentam fase vegetativa e reprodutiva, com isso gerando plantas maiores, um exemplo são as cultivares que podem ser plantadas do Rio Grande do Sul até Goiás (EMBRAPA, 2000). Já as cultivares de hábito de crescimento determinado têm suas regiões de adaptação mais restritas, para contornar essa situação, utiliza-se cultivares com período juvenil mais longo, alongando sua fase vegetativa, gerando plantas maiores e garantindo produtividades maiores (COBER, 2011).

2.6 Indicação de Cultivares por Regiões Edafoclimáticas

No Brasil, existem ecossistemas diversos, com diferentes tipos de solo e clima, considerando esses fatores, foi desenvolvida pela Embrapa a regionalização de indicação de cultivares de soja. O Brasil foi dividido em cinco macrorregiões sojícolas (MRS) e 20 regiões edafoclimáticas (REC) (Tabela 3) diferentes, para pesquisa e indicação de cultivares (CARNEIRO et al, 2014). Isso se torna importante, porque o ciclo da planta de soja é influenciado pelas condições edafoclimáticas, e com o uso da cultivar adequada a região produtora, obtém-se a capacidade máxima de produção.

Tabela 3. Relação das macrorregiões, regiões fisiográficas e regiões edafoclimáticas de adaptabilidade das cultivares de soja.

Macrorregião sojícola	Região edafoclimática	UF	Região fisiográfica
Macrorregião 1 SUL	Região 101	RS	Campanha
		RS	Depressão central
		RS	Baixo Vale do Uruguai
		RS	Litoral
		RS	Serra do Sudeste
		RS	Missões
		RS	Planalto Médio
	Região 102	RS	Alto Vale do Uruguai-Leste
		RS	Alto Vale do Uruguai-Oeste
		SC	Oeste
		SC	Meio-Oeste
		SC	Nordeste
		PR	Sudeste
		RS	Serra do Nordeste
Região 103	RS	Planalto Superior	
	SC	Centro-Norte	
	SC	Serra-Geral	
	PR	Centro-Sul	
	SP	Sul	
Região 104	SC	Litoral e vale do Itajaí	
	PR	Oeste	
Macrorregião 2 CENTRO-SUL	Região 201	PR	Norte
		SP	Médio Paranapanema
		PR	Noroeste
	Região 202	SP	Sudeste
		MS	Sul
	Região 203	SP	Centro-Sul
		SP	Oeste
	Região 204	MS	Centro-Sul
		MS	Sudeste
	Macrorregião 3 SUDESTE	Região 301	MS
GO			Sudeste
SP			Norte
Região 302		MG	Vale do Rio Grande do Sul
		GO	Sul
Região 303		MG	Triângulo e Alto Paraíba
		GO	Sudeste
		MG	Noroeste
Região 304		GO	Leste
		DF	---
Macrorregião 4	Região 401	GO	Centro
		MT	Sul
	Região 402	MT	Centro - Norte e Oeste

CENTRO-OESTE	Região 403	RO	Sul
	Região 404	MT	Leste
	Região 405	GO	Norte
TO		Sul (Gurupí)	
Macrorregião 5	Região 501	BA	Oeste
		PI	Sudoeste
	Região 502	MA	Sul
		TO	Centro-Norte (Pedro Afonso)
		PA	Sudeste (Redenção)
		MA	Nordeste (Paragominas)
Região 503	PA	Oeste (Santarém)	
	RR	Cerrado	

Fonte: KASTER & FARIAS (2011).

Há variações no ciclo da cultura (número de dias) usando uma mesma cultivar, produzida na mesma macrorregião ou macrorregiões diferentes, isso mostra que os fatores ambientais têm influência direta no ciclo da cultura. Um exemplo é a cultivar BRS 257, é indicada para macrorregião 1 e 2 (M1 e M2), e dentro da macrorregião (M1 e/ou M2), apresentam ciclos diferentes, sendo influenciado pela altitude local (altitude até 500m, ciclo de 114-120 dias; altitude 500-700m, ciclo de 122-128; acima de 700m dias, ciclo de 130-140 dias) ou seja, a temperatura é influenciada pela altitude, que por consequência interfere no ciclo de desenvolvimento da planta (CAVASSIM, 2014). O aumento da altitude ocasiona diminuição da temperatura, o que favorece o desenvolvimento mais lento da soja, com isso aumentando o ciclo da cultura.

A medida que vai mudando a macrorregião, o GMR aumenta, comparando a cultivar BRS 257 indicada para a M1 (Sul) e M2 (Centro-sul), com a cultivar BRS Carnaúba indicada para a M5 (Norte e Nordeste), verifica-se valores de GMR de 6,5 e 9.6 respectivamente. Essa variação ocorre em função da sensibilidade da soja ao fotoperíodo. A adaptabilidade de cada cultivar irá variar à medida que seu cultivo se desloca em direção ao sul ou ao norte, ou seja, quando há variação na latitude (FARIAS, 2011). Logo, cada cultivar tem uma faixa limitada de adaptação em função do seu grupo de maturidade.

Pelo exposto, observa-se que para a cultura da soja, questões referentes a fenologia da planta, ao ciclo da cultura e as cultivares são bastante consolidadas. Ano após ano há inovações e tecnologias de ponta voltada para a cultura. Cultivares são lançadas a cada ano, e nessas a grande maioria das informações são consistentes, o comportamento em cada região do país, o ciclo da planta, fases de desenvolvimento, a influência do fotoperíodo e temperatura. Isso ocorre porque a soja é uma das culturas mais importantes no país, ocupando o segundo lugar de maior produtor mundial do grão. Com isso há grande investimento em pesquisas referentes à cultura.

2.7 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante na atmosfera, forma quase 80% da atmosfera, encontrando-se na forma gasosa de N₂, que as plantas não são capazes de assimilar de forma direta, sendo o elemento mais importante para obter elevadas produtividades na agricultura tropical. Nos sistemas terrestres, é o elemento químico mais limitante para o crescimento vegetal (VITOUSEK & FARRINGTON, 1997). As plantas requerem N em quantidade superior a qualquer outro nutriente, e a

disponibilidade deste nutriente geralmente limita a produtividade das plantas em muitos ecossistemas naturais e agrícolas (EPSTEIN e BLOOM, 2005).

O N é um elemento essencial junto com H, O e C dos aminoácidos, amidas, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e coenzimas (TAIZ E ZIEGER, 2017; FAGAN et al., 2007), por isso, a deficiência de N rapidamente inibe o crescimento vegetal. Por ser um nutriente essencial, o seu balanço interfere na formação das raízes, no processo de fotossíntese, na produção, na translocação de fotoassimilados e na taxa de crescimento entre folhas e raízes, sendo que primeiramente afeta o crescimento foliar (RYLE et al., 1979; TAIZ & ZIEGER, 2004). Na falta desse nutriente, ocorrerá a diminuição do crescimento das plantas e haverá a redução da produtividade da cultura.

O fornecimento do N para as plantas ocorre de maneiras diferentes, isso varia com a espécie da planta. Este macronutriente pode ser absorvido na forma de amônio (NH_4^+), de nitrato (NO_3^-) ou do N_2 atmosférico através do processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (FAGAN et al., 2007) sendo o mais importante processo conhecido na natureza e realizado por micro-organismos procaríotos (bactérias diazotróficas). A primeira publicação sobre a capacidade das bactérias fixarem N_2 atmosférico foi descrita em 1888 (REIS et al., 2006).

Os tipos de FBN são: associações simbióticas e interações associativas. Nas associações simbióticas, há formação de uma estrutura especializada, que é o nódulo, onde bactérias do grupo de rizóbio que inclui, entre muitos outros, os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* convertem o N_2 atmosférico em amônia, que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por plantas da família das leguminosas (ARAÚJO et al., 2006). Um caso típico desta associação é a simbiose entre as plantas de soja e bactérias do gênero *Bradyrhizobium*. As associações simbióticas contribuem em média com 40 a 180 $\text{ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$ e alguns exemplos podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4. Contribuição da FBN em leguminosas de grão.

Cultura/Espécie	FBN ($\text{kg ha}^{-1} \text{ano}^{-1}$)
Alfafa (<i>Medicago sativa</i> L)	80-250
Amendoim (<i>Arachis hypogaea</i>)	33-297
Caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L.)	73-240
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	7-244
Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	30-50
Feijão-Mungo (<i>Vigna radiata</i>)	55
Guandu (<i>Cajanus cajan</i>)	7-235
Lentilha (<i>Lens culinaris</i>)	35-192
Soja (<i>Glycine max</i>)	17-450
Tremoço (<i>Lupinus albus</i>)	50-100
Trevo (<i>Trifolium pratense</i> L.)	22-150

Fonte: REIS et al. (2006).

As associações feitas através de interações associativas (não formam nódulos), realizadas tanto pelas bactérias que entram nos interstícios celulares (endofíticas) e as bactérias de vida livre, que vivem na rizosfera da planta e produzem uma série de benefícios na FBN (REIS et al., 2006).

Existem três grupos de bactérias que fazem essas associações simbióticas, que formam estruturas especializadas no processo da FBN, os nódulos. As bactérias que

fazem associações simbióticas são: Rizóbios (protobactérias) são os mais conhecidos, actinomicetos são bactérias filamentosas e as cianobactérias que são conhecidas como algas azuis, porém não são algas, são bactérias com habilidade de fixar N_2 (REIS et al., 2006).

Essas bactérias são mais eficientes no processo de FBN, o que ocorre porque as bactérias que formam nódulos controlam melhor o O_2 que pode desnaturar a enzima nitrogenase, que é a enzima responsável pelo processo de FBN e é sensível a presença de O_2 (MYLONA et al., 1995). Desta forma, em condição onde se tem a proteção da enzima do O_2 , torna a atividade dessa enzima mais eficiente, possibilitando maior eficiência na FBN.

A nitrogenase tem a função de reduzir o N molecular (N_2) em uma forma mais reduzida amônia (NH_3). O NH_3 é volátil, entretanto em sistemas biológicos, em pH da célula, essa amônia rapidamente se converte a amônio (NH_4^+), e este pode ser utilizado pela planta (TAIZ & ZIEGER, 2004). A estrutura da nitrogenase é basicamente formada por duas unidades proteicas, pelo complexo Ferro-proteína (Fe-proteína) e Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe proteína) (TAIZ & ZIEGER, 2004), além da ferredoxina que doa elétrons para permitir a conversão do N_2 (nitrogênio elementar) em NH_3 (amônia). Portanto, a planta tem uma dependência pelo Fe e Mo para o seu adequado funcionamento (Figura 1) (LONG et al., 2015).

A leg-hemoglobina que regula o fluxo do O_2 entre a nitrogenase e o bacteroide no nódulo é também constituída pelo Fe e expressa-se através da cor rósea do nódulo ativo (Figura 2) (LONG et al., 2015).

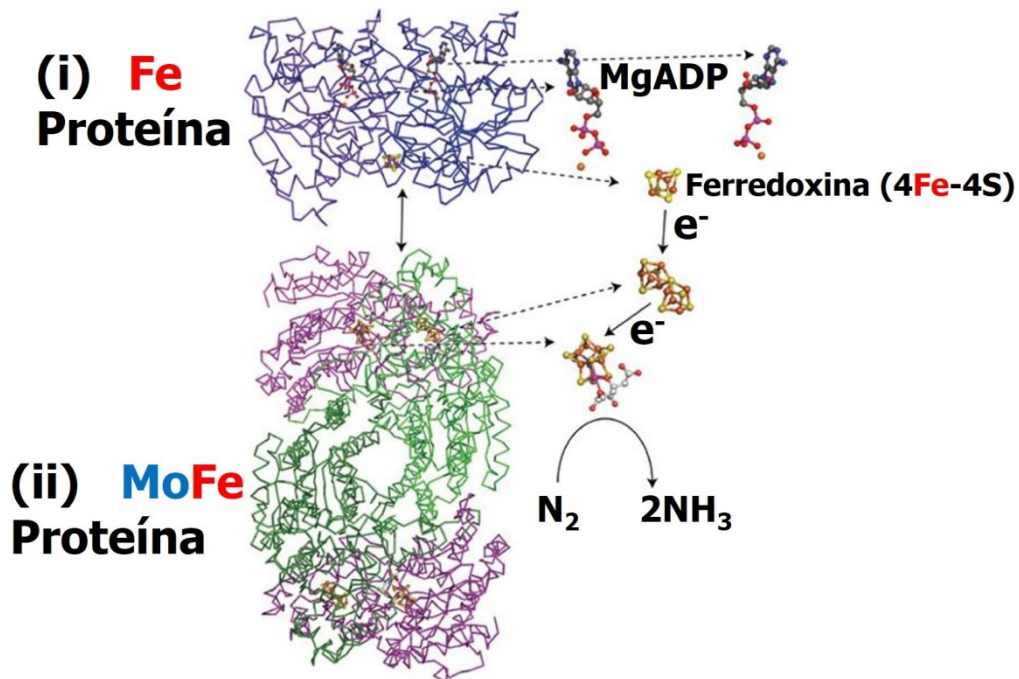


Figura 1. Estrutura do complexo MoFe e Fe proteína da nitrogenase e fluxo de elétrons entre as duas enzimas (LONG et al., 2015).

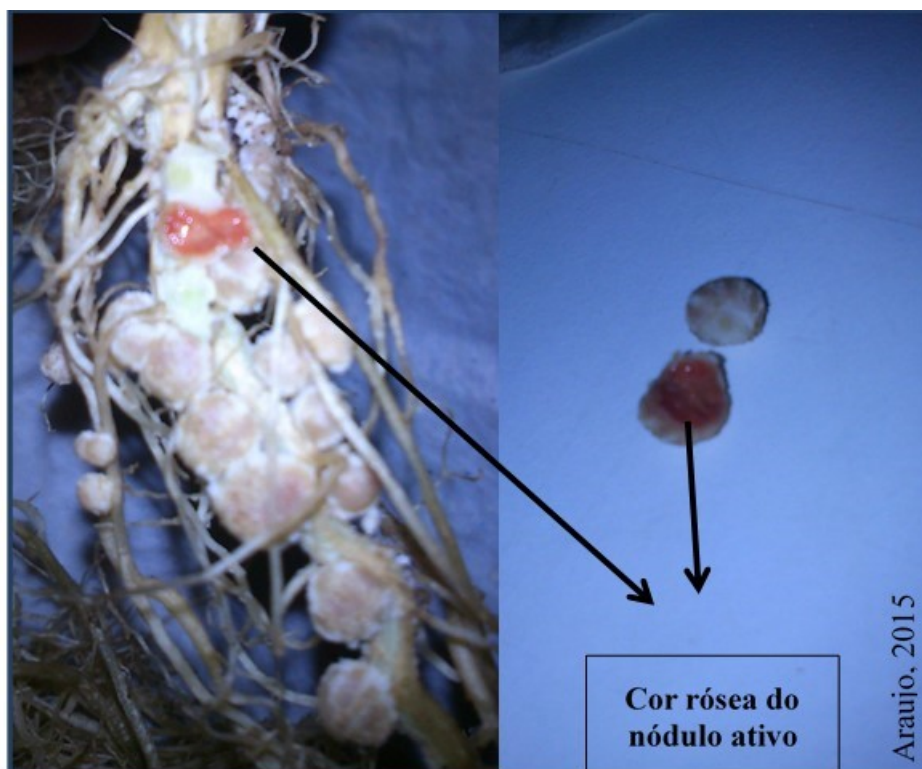


Figura 2. Coloração interna rósea de um nódulo ativo, pela presença da leg-hemoglobina.

Em se tratando do processo de FBN, lembra-se imediatamente de plantas da família das leguminosas, principalmente a soja. Isso se deve, porque o maior sucesso da tecnologia de uso de bactérias fixadoras de N_2 como inoculante é a cultura da soja, para qual não se recomenda a adubação nitrogenada no Brasil (REIS et al., 2006).

2.8 Contribuições da FBN Para a Cultura da Soja

A FBN na cultura da soja no Brasil é um dos exemplos de maior sucesso, uma vez que a utilização de inoculantes com *Bradyrhizobium* spp. supre toda a demanda da planta pelo N, e ainda proporciona uma grande economia. Na safra 2015/16, se toda a produção de soja do país, em 35 milhões de hectares, fosse produzida com adubação nitrogenada, a FBN nesta cultura daria ao país uma economia de N-fertilizante equivalente a US\$ 15 bilhões em fertilizantes nitrogenados para os 35 milhões de hectares cultivado.

Para uma produção de 2.400 kg ha^{-1} de grãos de soja seriam necessários aproximadamente $200 \text{ kg de N ha}^{-1}$ (HUNGRIA et al., 1997). Esta exigência de N pode ser suprida pelo processo de FBN. Isso é possível devido ao melhoramento genético da cultura da soja, associado à seleção de estirpes eficientes para a cultura, com isso garantindo a independência das plantas da soja em relação à adubação com N mineral (ALVES et al., 2003).

De acordo com Freire & Verneti (1999) as estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para a produção de inoculantes para soja no Brasil são oriundas da coleção SEMIA (seção de microbiologia agrícola) mantida pela organização FEPAGRO do Rio Grande do Sul, sendo elas a SEMIA 587 e 5019 (29 W), ambas pertencentes a espécie dos *Bradyrhizobium elkanii*, sendo posteriormente incluídas as estirpes SEMIA 5079 (CPAC 15) *Bradyrhizobium japonicum* e a SEMIA 5080 (CPAC 7)

Bradyrhizobium diazoefficiens (DELAMUTA et al., 2013), sendo esta última reclassificada recentemente, anteriormente classificada como *Bradyrhizobium japonicum*.

Segundo Alves et al. (2006) a FBN na cultura da soja, com inoculação de rizóbio e sob plantio direto, proporcionou entre 83 e 88% N total acumulado e balanço positivo de N para o sistema, resultados semelhantes foram obtidos utilizando a técnica de abundância de ureídeos por Hungria et al. (2006a). Em estudo feito por Macedo (2003) foram realizadas estimativas da FBN para lavouras de soja em sistemas de plantio direto, no noroeste do estado do Paraná, onde o N total acumulado variou de 60 a 99,8%. Para Pavanelli & Araújo (2009), a inoculação da soja cultivada nos solos sob cultivo de pastagens e culturas anuais, oriundos de sete municípios da região oeste paulista, apresentou incrementos de nodulação e fixação de N. De acordo com Smith & Hume (1987) (apud FAGAN et al, 2007) a associação do *Bradyrhizobium japonicum* com a soja pode resultar numa fixação de nitrogênio de até 103 kg ha⁻¹ de N. Na Argentina a soja inoculada com a estirpe E109, alcançou 6000 kg ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2006a), e em Londrina-PR, soja inoculada renderam 5890 kg ha⁻¹ (ZOTARELLI, 2000). Ainda no Brasil, um levantamento de estudos utilizando diluição isotópica ¹⁵N, abundância natural ¹⁵N, balanço de N e a técnica de abundância de ureídeos indicaram que o N derivado da FBN variou de 69 a 94%, com as taxas estimadas atingindo 300 kg ha⁻¹ de N (HUNGRIA et al., 2005). As contribuições da FBN podem ser consideravelmente mais elevadas, como o N na raiz não foi considerado nestes estudos, se foram utilizados o valores de 30 a 35% do total do N na planta propostos por Peoples e Herridge (2000) e Khan et al. (2002).

A eficiência do processo de FBN depende de vários fatores relacionados às plantas da soja e às bactérias. Condições físico-químicas do solo, como acidez, temperatura, umidade e a presença de teores adequados de nutrientes também influenciam na eficiência da FBN (AMADO et al, 2010). Dessa forma, é de grande importância entendermos o processo de FBN e os fatores que o controlam, pois com esses conhecimentos é possível adequar o manejo da planta, visando aumentar a eficiência de utilização de N e incrementar a produtividade da cultura, o que é de grande interesse.

2.9 Quantificação da Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas

Em torno de 95% do N, que se encontra no solo, está relacionado à matéria orgânica mineralizada no solo durante o ciclo das culturas, podendo, o NH₄⁺ liberado, ser absorvido pelas plantas. Como o N é um dos nutrientes mais limitantes da maioria dos cultivos, ao se depender apenas do processo da mineralização da matéria orgânica do solo, pode não se atingir a suficiência deste nutriente em plantas, especialmente em cultivos em solos com baixa disponibilidade da matéria orgânica (CAMARGO et al., 1999). Os processos da mineralização da matéria orgânica e o da fixação biológica do N atmosférico (FBN), através do cultivo de leguminosas, já forneciam o N para os sistemas de cultivos tradicionais, bem antes da produção de adubos nitrogenados minerais (GLIESSMAN, 2000).

Quantificar o processo da FBN é de suma importância, assim pode-se avaliar a real contribuição da FBN na ciclagem de N nos sistemas agrícolas, ainda sendo este processo uma fonte renovável de N para os cultivos, isto favorece sistemas de produção mais sustentáveis e mais econômicos (BODDEY et al., 1997; HUNGRIA & VARGAS, 2000).

Existem várias técnicas para avaliar a contribuição da FBN nas plantas, dentre elas temos: redução de acetileno (BURRIS, 1975), diferença de N total (BODDEY, 1987), balanço de N-total, (BODDEY, 1987; URQUIAGA et al., 1992), abundância natural de ureídeos (HERRIDGE & PEOPLES, 1990; ALVES et al., 1996) e as técnicas isotópicas baseadas no uso do ^{15}N .

2.10 Técnicas Isotópicas

Isótopos são átomos de um mesmo elemento químico que apresentam mesmo número de prótons (mesmo número atômico), mas diferenciam-se pelo número de massa ($A = \text{prótons} + \text{nêutrons}$). São ditos estáveis, por não emitirem radiação, ou seja, não alteram sua massa ao longo de sua existência (MARTINELLI et al., 2009). Os isótopos estáveis de grande interesse são: Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre, os quais ocorrem naturalmente na atmosfera. Os isótopos mais leves, com menor massa atômica são ^{12}C , ^1H , ^{16}O , ^{14}N , ^{32}S , são mais abundantes, enquanto que os isótopos que possuem massa atômica maior ^{13}C , ^2H , ^{17}O , ^{18}O , ^{15}N , ^{33}S , ^{34}S são mais raros (DUCATTI, 2007).

O uso de ^{15}N , baseia-se no fato que na natureza existem dois isótopos estáveis de N, um de peso atômico 14 e o outro de peso atômico 15. O N do ar é composto por 99,6337 átomos de ^{14}N e 0,3663% por átomos de ^{15}N (JUNK E SVEC, 1958), sendo essa proporção denominada abundância natural de ^{15}N . Compostos nitrogenados com proporções superiores a da abundância natural podem ser produzidos e estão comercialmente disponíveis.

As técnicas que baseiam-se no uso de isótopos de N, são bastante eficientes no estudo da FBN nos sistemas agrícolas (PEOPLES et al., 1997). Dentre essas técnicas cita-se: N_2 marcado com ^{15}N (MEEKS et al., 1978), diluição isotópica de ^{15}N (VALLIS et al., 1967; BODDEY et al., 1994) e abundância natural de ^{15}N (SHEARER & KOHL, 1986; BODDEY, 1987).

2.11 Técnica de $^{15}\text{N}_2$

Utilizando o isótopo de ^{15}N , é possível marcar compostos ou mesmo utilizar $^{15}\text{N}_2$ para quantificar a contribuição da FBN para as plantas. A técnica baseia-se no crescimento da planta numa atmosfera fechada contendo N_2 enriquecido com ^{15}N . É necessário que o enriquecimento do $^{15}\text{N}_2$ utilizado seja suficiente para promover um enriquecimento significativo de ^{15}N do N da planta, acima das variações de abundância natural (BODDEY et al., 1994). Um fator limitante para a aplicação desta técnica é a necessidade de se controlar vazamentos de gás nas câmaras de incubação. Outro fator limitante no uso da técnica é a manutenção de uma atmosfera normal para as plantas, controlando-se O_2 , CO_2 , transpiração, intensidade de luz, temperatura, visando manter o metabolismo normal da planta (RESENDE et al., 2003). Problemas como perdas de gases e períodos curtos de incubação em atmosfera controlada inibem a quantificação da FBN de maneira global, principalmente tratando-se de um processo que varia com as condições ambientais e o período de crescimento (REIS et al., 2006). Se a contribuição for muito pequena no período de incubação, erros derivados de variações na aplicação da técnica podem ocasionar valores de acúmulo de $^{15}\text{N}_2$ menores que os da planta-controle (MORRIS et al., 1995). A necessidade de se obter marcações altas nas plantas em períodos relativamente curtos de tempo implica em manter uma atmosfera com alto enriquecimento em $^{15}\text{N}_2$, que aliada aos elevados custos dos compostos enriquecidos, tornam os ensaios com $^{15}\text{N}_2$ extremamente caros (RESENDE et al., 2003).

A técnica de $^{15}\text{N}_2$ praticamente não se aplica para avaliar interações simbióticas, efeitos do manejo ou fatores edafoclimáticos nas contribuições da FBN as leguminosas, especialmente em condições de campo (BODDEY et al., 1994).

2.12 Diluição Isotópica

Atualmente a técnica disponível mais aceita para quantificar a FBN numa determinada cultura agrícola é a diluição isotópica de ^{15}N (BODDEY & URQUIAGA, 1992). Esta técnica permite quantificar a contribuição da FBN em todo o ciclo da cultura, e se avaliar o N fixado que foi incorporado na planta. Desta forma a técnica pode medir o benefício da FBN durante o desenvolvimento das plantas (PEOPLES et al., 1989).

Para o uso da técnica de diluição isotópica, utiliza-se compostos nitrogenados, em que parte do teor de N disponível esteja na forma de ^{15}N , adicionado na forma de fertilizante ao solo para ser absorvido pelas plantas. Plantas que não se beneficiam do processo de FBN e que só obtém nitrogênio do solo que foi marcado, terão um enriquecimento em ^{15}N igual ao deste solo. De outra forma, plantas que obtenham além do N marcado proveniente do solo, N do ar, sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N (RESENDE et al., 2003). Uma vez que a planta absorve este isótopo juntamente com o ^{14}N , pode-se discriminar essa absorção utilizando um espectrômetro de massa com sensibilidade suficiente para quantificar o ^{15}N nas amostras de tecidos vegetais e subtrair da abundância natural (McAULIFFE et al., 1958). Quanto maior a diluição, maior será a quantidade de N do ar incorporado a planta, logo maior a contribuição da FBN.

Para a quantificação da contribuição de FBN na planta, depende da comparação com uma planta-controle que se deve escolher ou através da análise do enriquecimento de ^{15}N do N mineral.

As plantas-controle não podem fixar N_2 , ou seja, todo o N absorvido pela planta virá do conteúdo disponível no solo. Ainda devem possuir taxa de crescimento semelhante à da planta teste, e ter um sistema radicular que explore as mesmas camadas de solo que a planta teste (REIS, et al., 2006). No caso de leguminosas, utilizar planta-controle da mesma espécie botânica da planta teste, porém de variedades não nodulantes, são mais apropriadas.

A premissa de que as plantas controle precisam ter o sistema radicular que explore as mesmas camadas de solo que a planta teste, se deve ao fato de que, ao se adicionar fertilizante marcado com ^{15}N , a disponibilidade da forma marcada (NH_4^+ ou NO_3^-) geralmente varia de acordo com a profundidade e com o tempo. Se 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 (RESENDE, et al., 2003). Entretanto, tal estabilidade é extremamente difícil de se obter em condições de campo, devido a dinâmica do nitrogênio no solo. Sendo assim, plantas com absorção diferenciadas ao longo do tempo e espaço explorado pelas raízes terão uma marcação diferente, gerando um erro na estimativa da contribuição da FBN (WITTY, 1983).

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

$$\% \text{FBN} = 100 \times \frac{(\% \text{ átomos } ^{15}\text{N} \text{ excesso}_{\text{testemunha}} - \% \text{ átomos } ^{15}\text{N} \text{ excesso}_{\text{teste}})}{(\% \text{ átomos } ^{15}\text{N} \text{ excesso}_{\text{testemunha}})}$$

Onde:

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

Apesar da técnica que utiliza N_2 enriquecido com ^{15}N ser a única prova direta da contribuição da FBN para as culturas, considera-se que a técnicas mais adequada para produzir resultados confiáveis em condição de campo são as baseadas na diluição isotópica de ^{15}N (BODDEY & URQUIAGA, 1992). A diluição isotópica de ^{15}N produz estimativas indiretas, mas são adequadas para estudos em condições de campo.

2.13 Abundância Natural de ^{15}N

Como o N do solo é levemente enriquecido com o isótopo ^{15}N em comparação ao N_2 do ar é possível usar este fenômeno para quantificar a FBN (SHEARER & KOHL, 1986). Esta forma de aplicar a técnica de diluição é chamada a técnica de abundância natural do ^{15}N . Diversos dados na literatura, indicam que existem diferenças significativas entre a abundância natural de ^{15}N do solo e a do ar (CHENG et al., 1964; BLACK & WARING, 1977; SHEARER et al., 1978; STEELE et al., 1981). Plantas que recebem contribuições significativas da FBN acumularão teores de N de duas fontes: solo e ar, diluindo essa marcação natural. Estas diferenças se devem a vários processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem no solo (DEWICHE E STEYN, 1970; DOMENACH & CHALAMET, 1977; MARIOTTI et al., 1981; TURNER et al., 1983).

Com o surgimento de espectrômetro de massas mais sensível, é possível diferenciar a taxa de absorção dos isótopos de N entre plantas. Esses equipamentos podem comparar simultaneamente, a abundância isotópica da amostra e de um padrão (N_2 do ar).

O enriquecimento natural de ^{15}N no N disponível do solo é pequeno, normalmente a diferença está na terceira casa decimal da % de átomos de ^{15}N em excesso, devido a isso usa-se a unidade de delta (δ) (GUIMARÃES, 2005). O δ seria o excesso de ^{15}N relacionado à abundância natural de um padrão (ar), multiplicado por mil. Assim, usando o ar como padrão, uma unidade delta equivale a 0,0003663 átomos % de ^{15}N em excesso. Sendo assim, as plantas que obtém do ar a grande parte do N para o seu desenvolvimento teriam 0,0 átomos % de ^{15}N em excesso, ou $\delta^{15}\text{N}$ bem próximos a zero (RESENDE et al., 2003). Diferentemente, as plantas não fixadoras crescendo no mesmo solo, teriam valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados e próximos aos do solo, já que o N necessário para o seu desenvolvimento é derivado do solo.

A quantificação (%) da FBN através da técnica de abundância natural ^{15}N é calculada de acordo com a equação:

$$\% \text{FBN} = 100 \times \frac{(\delta^{15}\text{N}_{\text{testemunha}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{teste}})}{(\delta^{15}\text{N}_{\text{testemunha}} - B)}$$

Onde:

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

$\delta^{15}\text{N}$ da planta teste = valor de $\delta^{15}\text{N}$ da planta fixadora de N_2 ;

'B' = Valor da abundância do ^{15}N na planta quando está totalmente dependente a FBN.

Como todas as técnicas utilizadas para determinar a contribuição da FBN, esta técnica também possui limitações, sendo necessário algumas considerações, tendo como premissa básica que as plantas fixadoras e não-fixadoras, crescendo no mesmo solo, absorvam nitrogênio do solo com a mesma marcação com ^{15}N (SHEARER & KOHL, 1986). Isso pode ser contornado usando plantas referência, que apresentem desenvolvimento radicular e demanda de N semelhantes à planta testada, já que não

existe uma outra técnica para conferir o N derivado do solo absorvido pela leguminosa. Outro fator limitante é o alto custo das análises e o risco de contaminação das amostras, sendo assim exige um cuidado maior na manipulação das amostras (BODDEY, 1987).

Outro fator importante a considerar são os valores de fracionamento isotópico que parecem ocorrer durante as transformações do nitrogênio no sistema solo-planta, tornando-se necessário à determinação do valor 'B', que é a marcação natural de ^{15}N da planta leguminosa crescida com total dependência da FBN (SHEARER & KOHL, 1986), que a princípio, seria constante para cada cultura.

Unkovich & Pate, (2000) levantou a hipótese de que no processo da FBN o fracionamento pode não existir. Já Peoples et al. (1989) acreditam que o fracionamento isotópico depende da espécie cultivada, das estirpes das bactérias diazotróficas envolvidas, e do estágio e condições de crescimento da planta.

Alguns estudos demonstraram diferenças na abundância natural de ^{15}N em partes das plantas, que podem ter sido influenciadas pela variedade da planta e pelas estirpes inoculadas (STEELE et al., 1983; BERGERSEN et al., 1988; YONEYAMA et al., 1986). Estudos mostram que o ^{15}N se encontra em uma proporção maior nos nódulos e nas raízes quando se compara com a quantidade encontrada na parte aérea das plantas (GUIMARÃES et al., 2008; PAU-FERRO et al., 2010; PACHECO et al., 2017; ARAUJO et al., 2018), este fato pode acontecer devido o ^{15}N ser mais pesado, ocasionando esse fracionamento isotópico do ^{15}N na planta. Em diversos estudos de quantificação da FBN, utiliza-se apenas a parte aérea da planta onde a abundância de ^{15}N é menor, com isso superestimando a FBN.

Pau-Ferro et al. (2010), estudando diferentes cultivares de soja (CD 202, EMB 48, M-SOY 8001, BRS 133, Celeste) inoculadas com *Bradyrhizobium diazoefficiens* estirpe 5080 e *Bradyrhizobium elkanii* estirpe 5019 encontrou valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ iguais a -0,76 e -1,66‰ nas partes aérea, +6,39 e +6,47‰ nas raízes, e +11,65 e +9,59‰ nos nódulos, respectivamente. Estudo realizado Peoples et al. (1989), avaliando a abundância natural de ^{15}N em plantas de soja cultivar Forrest cultivadas no campo, encontrou valores de $\delta^{15}\text{N}$ de +3,7‰ no terço inferior da planta, +3,0‰ no terço médio e +2,2‰ no terço superior da planta, +1,5‰ nas folhas do ápice que foram o menor valor.

Unkovich & Pate, (2000) relatam que valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$, são frequentemente encontrados na parte aérea de diferentes espécies de leguminosas, quando o seu desenvolvimento é completamente dependente da FBN, o que indica uma distribuição diferenciada na planta do ^{15}N durante o processo de FBN. Araujo et al. (2018) em estudo utilizando a cultivar de soja BRS 133, inoculadas com diferentes estirpes de *Bradyrhizobium*, em condições de luminosidades diferentes (sol e sombra) encontrou valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ iguais a -1,73 (sol) e -0,74 (sombra) na parte aérea das plantas.

A técnica de abundância natural do ^{15}N , como todas as outras técnicas utilizadas na determinação da contribuição da FBN para as plantas, também apresenta limitações, como os problemas voltados para a real estimativa do valor de 'B', como vantagem deste método temos o fato de não haver necessidade de adição de N marcado, evitando os problemas de inibição da fixação de N_2 e de estabilidade da marcação ao longo do tempo (SHEARER & KOHL, 1986). A técnica de abundância natural de ^{15}N , é uma técnica bastante difundida e aceita para a quantificação da contribuição da FBN para as plantas.

2.14 Nitrogênio do Solo Derivado do Sistema Radicular da Planta

Para garantir altos rendimentos na cultura da soja são necessárias grandes quantidades de N, é necessário cerca de 80 kg N para cada tonelada de grão produzido. O N requerido para o desenvolvimento da planta pode ser disponibilizado através da aplicação de fertilizantes nitrogenados, decomposição da matéria orgânica do solo e da FBN, que é a forma predominante no Brasil. Isso ocorre devido a simbiose muito eficiente que ocorre entre as plantas de soja e as bactérias diazotróficas do gênero *Bradyrhizobium* (ZILLI et al., 2006).

O uso do inoculante para a produção da soja, implica em um menor custo de produção, na redução dos problemas com poluição ambiental, devido ao uso de fertilizantes nitrogenados. Ainda, o processo da FBN dependendo da sua magnitude, pode ser determinante para elevação dos níveis de matéria orgânica do solo (URQUIAGA et al., 2002). Neste ponto existe uma incógnita, pois existe a dificuldade de avaliar a biomassa radicular produzida ao longo do desenvolvimento da planta e o conteúdo de N, com isso há um impedimento que se tenha uma estimativa mais real quanto à contribuição das culturas para o balanço de N do solo (ARAÚJO, 2004).

Há poucos estudos que determinam a quantificação do N acumulado no sistema radicular das plantas, em condições de campo, o fator limitante são as metodologias adotadas. Diferentes autores utilizaram os métodos diretos, como a escavação para coleta de raízes e determinação do teor de N, no entanto, sua eficiência é questionada (RUSSELL & FILLERY, 1996a,b; McNEILL et al., 1997; KHAN et al., 2002a), já que considera somente o N das raízes visíveis, descartando o N do solo proveniente dessas raízes, na forma de raízes não recuperadas, exsudados radiculares e raízes mineralizadas durante o desenvolvimento da planta (ARAÚJO, 2004).

No momento de peneirar o solo, não é possível recuperar todas as raízes presentes, com isso o método tradicional pode subestimar o N total presentes nas raízes. Estudos usando ^{15}N sugerem que apenas uma pequena proporção do N total das raízes pode ser facilmente recuperado como raízes intactas e nódulos (RUSSELL & FILLERY 1996b; McNEILL et al. 1997). O fator mais limitante é estimar o quanto se perde nesse processo.

Trabalhos feitos com trigo (ZOTARELLI, 2000) e cana-de-açúcar (SOUTO et al., 1993), mostraram que durante o ciclo das plantas, cerca de 20 a 30% do N acumulado até o final do ciclo vegetativo não é mais contabilizado na planta na ocasião da colheita, ainda que sejam incluídas as folhas senescentes. Grande parte das perdas, pode ser explicada pela volatilização de amônia através das folhas. É possível que processos como exsudação de N e mineralização de raízes sejam de grande importância para explicar o balanço de N das plantas (WETSELAAR & FARQUHAR, 1980).

O uso do isótopo ^{15}N para marcação das raízes constitui uma técnica que permite a quantificação de todo o N existente no solo derivado das raízes, partindo da premissa de que, após a marcação, o enriquecimento de ^{15}N é uniforme em todo o N derivado ou existente nas raízes das plantas (RUSSEL e FILLERY, 1996). O uso da técnica tem estimado que o N das raízes não recuperadas pelo peneiramento (NRNR) pode representar até 80% do N total do sistema radicular (MAYER et. al., 2003). Algumas estratégias para marcação do sistema radicular das plantas têm sido propostas (McNEILL et al., 1997; PEOPLES e HERRIDGE, 2000), e dentre estas, a marcação foliar com ^{15}N é de fácil utilização e permite uma marcação uniforme do N das raízes (RAMOS et al., 2001). A técnica foi empregada para diversas leguminosas como pode ser vista na Tabela 1, no entanto, somente dois estudos foram feitos para a cultura da soja (ROCHESTER et al., 1998; ARAÚJO et al., 2004).

A real contribuição da exsudação radicular no fornecimento de N ao solo não é tão conhecida. Estudos feitos por Mayer et al. (2003) e Khan et al. (2003), utilizando o isótopo ^{15}N , estimaram que cerca de 15 a 23 % do total de N acumulado na planta correspondem ao N de raízes não recuperadas pelo método mecânico.

Os danos causados no sistema radicular podem ser responsáveis pela maior parte das substâncias orgânicas liberadas durante o crescimento da planta (ARAÚJO, 2004). Estudos realizados mostraram que a quantidade de aminoácidos provenientes de exsudados radiculares de plantas de trigo cultivadas em solução nutritiva, após 14 dias, não foi sensível ao teste de cromatografia, indicando uma quantidade inferior a 3 μg por 15 plantas. Já Ayers & Thornton, (1968) observaram em estudo feito com ervilha, cultivada nas mesmas condições, apresentou de 2 a 7 μg de N-aminoácidos por planta. Nestes estudos foi visto que quando ocasionaram danos às raízes, apresentaram em uma hora, exsudação de 73 a 120% superior a exsudação normalmente observada em um período de duas semanas.

O que pode influenciar a exsudação do N pelo sistema radicular é a taxa de oxigênio e dióxido de carbono presente na rizosfera (AYERS & THORNTON, 1968), e em se tratando de leguminosas, essa exsudação pode ser estimulada pelo consórcio com gramíneas (WACQUANT et al., 1989). Wacquant et al. (1989) relataram o enriquecimento de nitrato observado na solução nutritiva, derivado do sistema radicular de leguminosas, ocorrendo principalmente à noite, devido a menor transpiração.

Tabela 5. Relação do N derivado das raízes não recuperadas (NRNR) de leguminosas em relação ao N total acumulado pela planta.

Cultura/Espécie	NRNR (%)	Referências
Soja (<i>Glycine Max</i> , L)	39; 16	ROCHESTER et al. (1998); ARAÚJO et al. (2004).
Ervilha (<i>Pisum sativum</i> , L.)	7; 13; 11; 32; 29	JENSEN et al. (1996); MAYER et al. (2003); SCHMIDTKE (2005a); WICHERN et al. (2007a); WICHERN et al. (2007b).
Tremoço branco (<i>Lupinus albus</i>)	18	MAYER et al. (2003).
Tremoço azul (<i>Lupinus angustifolius</i>)	18	RUSSELL & FILLERY (1996a).
Grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i>)	43; 75	KHAN et al (2002a); KHAN et al. (2002b).
Feijão fava (<i>Vicia faba</i>)	13; 23	MAYER et al. (2003); KHAN et al. (2002b).
Feijão Guandu (<i>Cajanus cajan</i>)	37	KHAN et al. (2002a).
Feijão-mungo (<i>Vigna radiata</i>)	17	KHAN et al. (2002a).
Feijão de porco (<i>Canavalia ensiformis</i> , L.)	10	RAMOS et al. (2001).
Trevo (<i>Trifolium subterraneum</i>)	10	McNEILL et al. (1997).
Mucuna cinza (<i>Mucuna</i> sp.)	14	RAMOS et al. (2001).
Serradela (<i>Ornithopus sativus</i>)	20	McNEILL et al. (1997).
Chícharo (<i>Lathyrus sativus</i>)	9	SCHMIDTKE (2005a).

Fonte: WICHERN et al., (2008); ARAÚJO (2004).

Em trabalhos feitos por Rochester et al. (1998) para soja e em outros estudos com leguminosas de grãos (HERRIDGE et al., 2008; WICHERN et al., 2008) a média do N nas raízes e o NRNR soma mais de 30 % do N total na planta inteira. Como estima-se que uma cultura de soja com um rendimento médio de 3.300 kg grão ha⁻¹ (média brasileira do ano agrícola de 2016/17 – IBGE-SIDRA, 2017), o N acumulado na base de matéria seca é de aproximadamente de 185 kg N. Caso que a estimativa de NRNR + N das raízes seja de 30 % do N total da planta inteira, a contribuição residual do N da cultura de soja seria em termos de 100 kg N ha⁻¹ (30 % de 315 kg). Existe um consenso que a soja deixa algum benefício para a cultura subsequente, mas não desta ordem de grandeza (HUNGRIA et al., 2006b). Existem poucos estudos que avaliaram diretamente no campo a contribuição do N residual da cultura da soja para uma forrageira ou cultura

de cereais imediatamente depois na rotação (ALVES et al., 2006; ZOTARELLI et al., 2012). Nestes estudos a contribuição do N residual da soja foi avaliado e não ultrapassou 30 kg N ha⁻¹.

A avaliação da contribuição do NRNR também tem importância para avaliar a possibilidade que este N e outro derivado de raízes de soja é imobilizado no solo na forma de matéria orgânica o processo que constitui o “sequestro do carbono” no solo. Em estudos de longo prazo feitos em vários sítios no sul pela equipe da Embrapa-Agrobiologia em parceria da Embrapa Trigo e UFRGS, encontraram se pouco ou nula acumulação do N e C no solo na rotação soja/trigo, e só houve acúmulo da MOS em rotações que incluíram uma leguminosa-adubo verde que resultou em um balanço positivo do N durante a rotação (SISTI et al., 2004; DIEKOW et al., 2005; BODDEY et al., 2010). Mas uma vez esta evidência indica que as avaliações do NRNR já publicadas na literatura estejam superestimadas.

A validação da técnica da marcação foliar com ¹⁵N para avaliar o NRNR vem da possibilidade de altas contribuições do N residual da soja poderia provocar emissões de óxido nitroso (N₂O), gás de efeito estufa (fator de aquecimento global = ~300 vezes do CO₂). Os relatórios do painel intergovernamental de mudança da clima (IPCC na sigla inglês) estimaram que 1 % de todo N nos resíduos de leguminosas (e outras culturas) é liberado na forma de N₂O. O material vegetal contado como resíduos é somente a parte aérea (IPCC, 2006). Caso existam grandes contribuições de N derivado das raízes da soja é possível que as emissões de N₂O estimado pelo fator “default” do IPCC sejam subestimadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do Experimento

O experimento foi instalado em 22 de outubro de 2015, em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, em vasos plásticos preenchidos com 6 kg de solo. O solo em estudo foi coletado na profundidade de 0-20 cm, na área experimental da Embrapa Agrobiologia (Terraço). Teve suas características químicas analisadas no laboratório de química agrícola da Embrapa Agrobiologia. Segundo os procedimentos do Manual de Análises Químicas dos Solos, Plantas e Fertilizantes e do Manual de Métodos de Análises de Solos (Embrapa 1997) e classificado como Argissolo Vermelho Amarelo Distrófico. O solo coletado foi seco ao ar e passado em peneira grossa para facilitar a homogeneização. A correção do solo foi feita duas semanas antes do plantio, com aplicação de CaCO_3 na dose de $500 \text{ mg kg de terra}^{-1}$ e adubação com $229 \text{ mg P}_2\text{O}_5 \text{ kg terra}^{-1}$, $80 \text{ mg K}_2\text{O kg terra}^{-1}$ e $50 \text{ mg de micronutrientes por kg terra}^{-1}$ (FTE). Utilizou-se o delineamento experimental em blocos casualizados, com esquema de parcelas subdivididas, em cinco repetições. A variedade de soja cultivada foi a BRS 360RR, esta cultivar apresenta tipo de crescimento indeterminado, pertence ao grupo de maturidade 6.2, precoce, tendo um ciclo de 104 a 129 dias. As sementes foram inoculadas utilizando-se inoculante turfoso a base de *Bradyrhizobium* spp., os inoculantes foram das estirpes SEMIA 5019 (29 W - *B. elkanii*) e SEMIA 5080 (CPAC 7 - *B. diazoefficiens*), mantendo-se uma planta por vaso após o desbaste. Os tratamentos consistiram em marcação foliar, com ^{15}N usando duas fontes de N, sendo ^{15}N -ureia e ^{15}N - glutamina, e seis épocas de coleta, que foram realizadas aos 2, 7, 14, 25, 47 e 70 dias após a marcação (DAM) com o isótopo ^{15}N , correspondendo aos estádios V₄, R₁, R₃, R₅, R₆ e R₇, respectivamente (Tabela 1). Plantas de soja foram cultivadas e não foi realizada a marcação foliar com ^{15}N , para que no momento da realização dos cálculos o delta do solo não marcado fosse conhecido e subtraído do solo marcado.

A marcação foliar, com ^{15}N , foi feita em todas as plantas, no estágio V₄, aproximadamente aos 27 dias após o plantio. Nesta ocasião, a folha central do último trifólio, com folhas totalmente expandidas, foi cortada ao centro, longitudinalmente, liberando sua nervura principal, permitindo a sua inserção em microtubos contendo 1,0 ml de solução 0,5% de ureia enriquecida com 95,5 % átomos de ^{15}N ou contendo 1,0 ml de solução 0,5% de glutamina enriquecida com 98,5 % átomos de ^{15}N (Figura 3), e sendo mantida por um período de 24h.



Figura 3. Etapas para corte da folha: **(a)** Corte da folha com bisturi; **(b)** imersão da folha na solução ^{15}N ; **(c)** folha imersa na solução enriquecida com ^{15}N ; **(d)** cobertura do microtubo.

Para evitar contaminação do solo com ^{15}N proveniente da parte aérea, a parte superior do vaso foi coberta com papel alumínio (Figura 4) e o fornecimento de água foi localizado, aplicando-se a água diretamente no solo. Foram realizadas coletas diárias das folhas senescentes.



Figura 4. Visão geral do experimento. Solo coberto com papel alumínio.

3.2 Coleta do Experimento

No momento da coleta, a parte aérea da planta foi cortada e subdividida em caule, primeira folha, segunda folha, terceira folha, quarta folha, quinta folha e sexta folha, esse procedimento foi realizado até a quarta coleta (2, 7, 10 e 14 DAM), a partir da quinta coleta a parte aérea foi coletada, e mantida inteira. Em seguida foram coletados raízes e nódulos.

O solo foi peneirado para retirada das raízes remanescentes. Esse solo foi peneirado em peneiras com malhas de 2 mm, 1,0 mm, 0,5 mm e 0,125 mm, para recuperação da maior quantidade possível de raízes visíveis. As raízes recuperadas foram acondicionadas em sacos plásticos, congeladas e secas em liofilizador, por um período de 24h. Todo o solo presente no vaso foi pesado e foi separada uma sub-amostra de solo para determinação da umidade em estufa a 105 °C, após esse processo, o solo foi seco ao ar.

3.3 Processamento de Amostras e Cálculos de mg ¹⁵N por Planta e NRNR

A parte aérea das plantas e nódulos foram secas em estufa (>72 h, 65°C). As raízes, após a liofilização, foram submetidas a um processo manual de limpeza, onde foi retirado o solo rizosférico. O sistema radicular foi dividido em raiz primária, raiz secundária e raiz fina (Figura 5), estas raízes, juntamente com os nódulos foram moídas com auxílio de N líquido, até formar um pó.

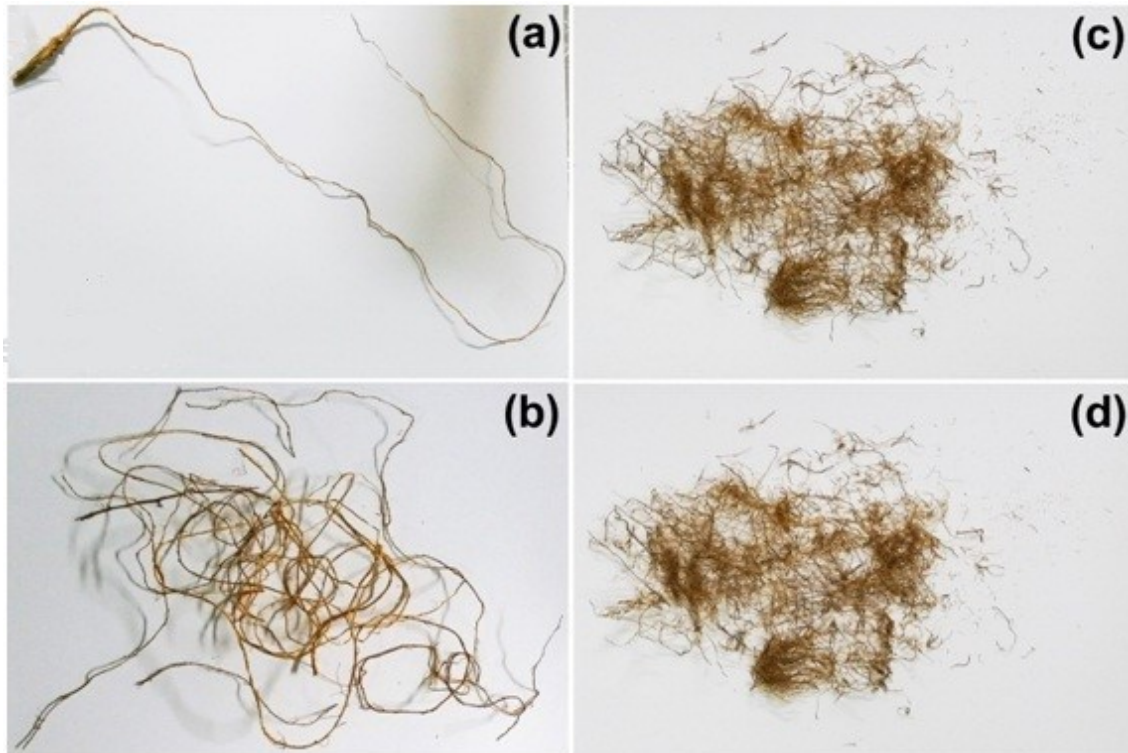


Figura 5. Raiz de soja da primeira coleta (dois dias após marcação). **(a)** Raiz Principal; **(b)** Raízes Secundárias; **(c-d)** Raízes Finas.

A parte aérea, raiz, nódulo e solo rizosférico foram pesados, para determinação da matéria seca. A parte aérea foi moída em moinho de facas tipo Wiley (peneiras de 2,0 mm). Posteriormente, sub-amostras de solo, solo rizosférico e parte aérea, foram moídas, até formar pó, em moinho de rolo similar ao descrito por Arnold e Schepers (2004). Depois do processamento de todo o material, pesou-se alíquotas, para análises de %N e ^{15}N em excesso pelo método de Dumas, utilizando um espectrômetro de massa de razão isotópica de fluxo contínuo (Finnigan DeltaPlus ou espectrômetro de massa Delta V Finnigan MAT, Bremen, Alemanha) acoplado à saída de um analisador C e N total da Costech (modelo ECS4010) no Laboratório de Isótopos Estáveis John Day na Embrapa Agrobiologia, conforme descrito por RAMOS et al. (2001).

Para a estimativa de $\text{mg } ^{15}\text{N planta}^{-1}$ foi utilizada a equação:

$$\text{mg } ^{15}\text{N planta}^{-1} = (\text{N}_{\text{total}} \times \text{atom } \%^{15}\text{N excesso})/100$$

Onde:

N_{total} é a %N, multiplicado pela massa seca (**g por planta ou solo**) x 10.

atom $\%^{15}\text{N}$ excesso é o atom $\%^{15}\text{N}$ da amostra, menos a abundância natural do ar (0,3663);

Para a estimativa do N de raízes não recuperadas (NRNR) foi utilizada a equação:

$$\text{NRNR} = ({}^{15}\text{N}_{\text{solo}}/{}^{15}\text{N}_{\text{RR-N/g}})$$

Onde:

${}^{15}\text{N}_{\text{solo}}$ é a quantidade de ^{15}N em excesso (mg) encontrado no solo;

${}^{15}\text{N}_{\text{RR-N/g}}$ é a quantidade de ^{15}N em excesso em cada grama de N das raízes recuperadas.

A quantidade de N acumulado nas raízes recuperadas foi calculada a partir de seus respectivos teores de N-total e peso da matéria seca.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente para separar as médias ao teste 't', por meio do software 'R' versão 3.2.2 (R Development Core Team, 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Acúmulo de Massa Seca e Nitrogênio Total em Plantas de Soja

Para os parâmetros massa seca e N total, não foram observadas diferenças significativas entre as duas fontes de N aplicado para marcação foliar. As variáveis analisadas (massa seca das folhas, caule, raízes, parte aérea inteira, raiz total, nódulo e planta inteira) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos de ureia e glutamina (Figura 6, 7, 8 e 9). Isto indica que a marcação foliar não interferiu no processo da FBN ou no acúmulo do N do solo.

O acúmulo de massa seca no período de 2 a 14 dias após a marcação (DAM) apresentou um crescimento exponencial na parte aérea e raízes (Figuras 6). Entretanto, houve uma pequena interrupção do acúmulo do N total entre dias 7 e 10 DAM (30 e 33 dias após plantio – DAP) (Figura 7). É possível que esta pequena queda no acúmulo do N nas plantas nesta época tenha alguma relação com um possível efeito deletério do acúmulo de N da FBN promovido pelo estresse devido ao corte da folha e a introdução de N solúvel estranho (ureia ou glutamina) nos tecidos da planta.

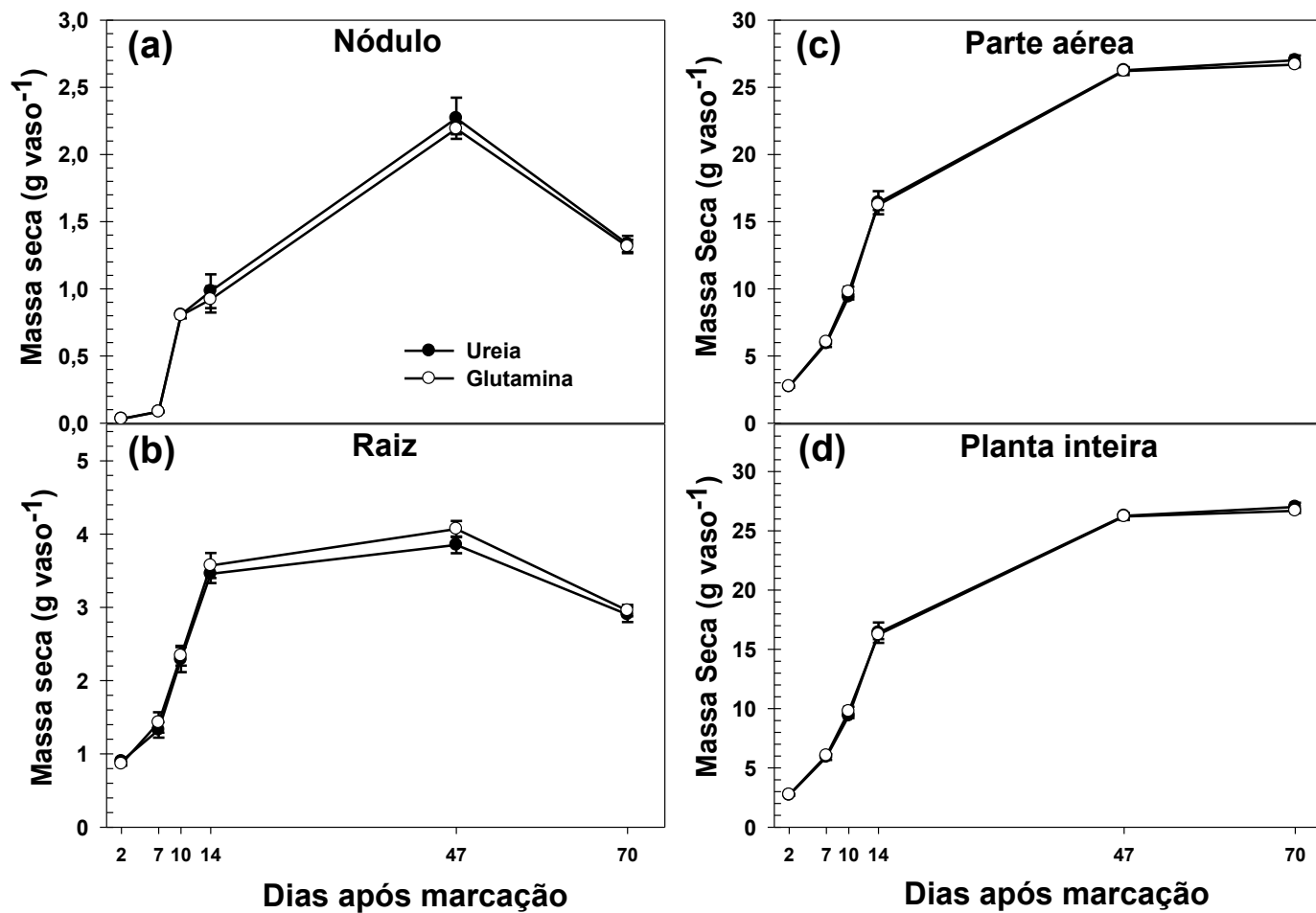


Figura 6. Acúmulo de massa seca por diferentes tecidos de plantas de soja marcadas via foliar com ureia ou glutamina, em seis épocas de coleta. (a) nódulo; (b) raiz; (c) parte aérea; (d) planta inteira.

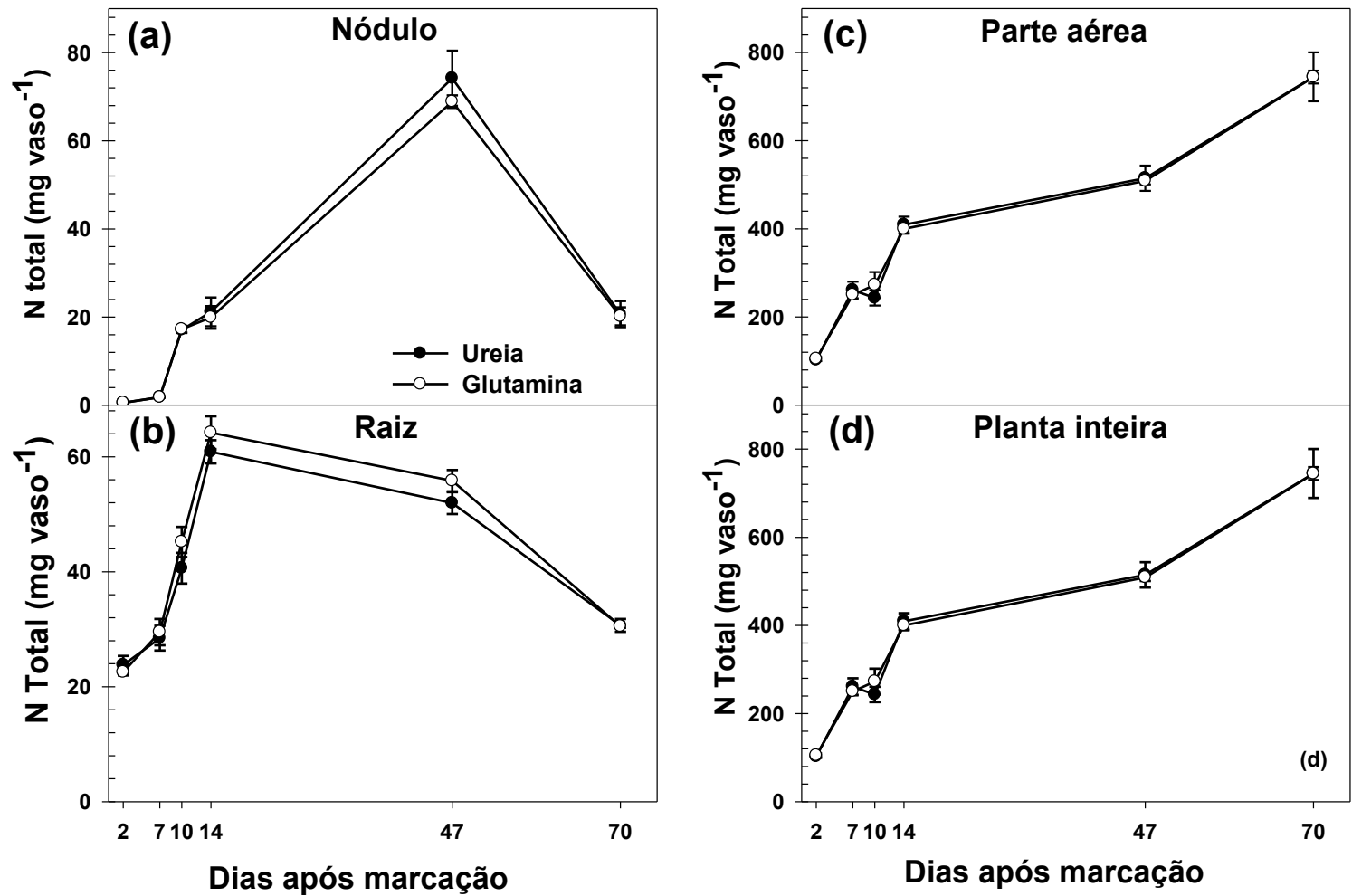


Figura 7. N acumulado por diferentes tecidos de plantas de soja, marcadas via foliar com ureia ou glutamina, em seis épocas de coleta. (a) nódulo; (b) raiz; (c) parte aérea; (d) planta inteira.

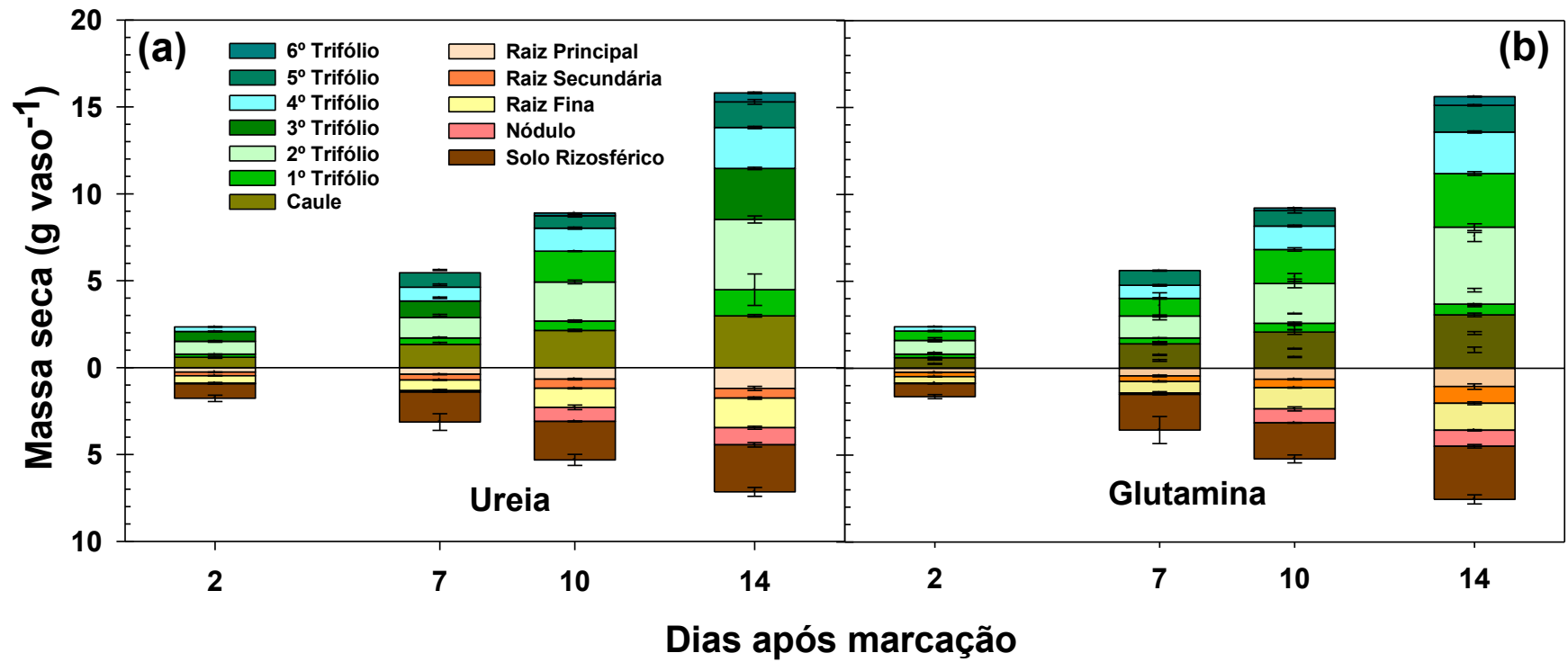


Figura 8. Acúmulo de massa seca por diferentes tecidos da planta de soja e solo rizosférico. **(a)** marcação foliar com ureia; **(b)** marcação foliar com glutamina.

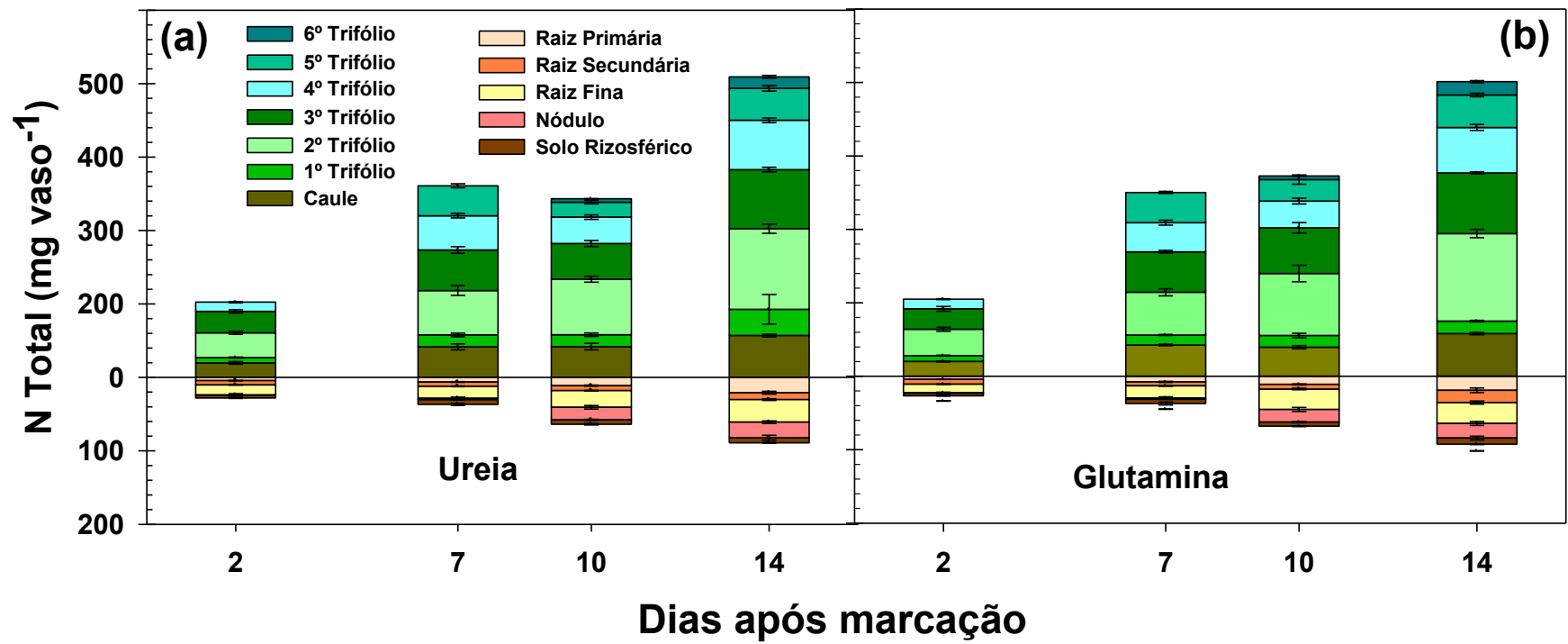


Figura 9. N total acumulado por diferentes tecidos de plantas de soja e solo rizosférico. **(a)** marcação foliar com ureia; **(b)** marcação foliar com glutamina.

4.2 Diluição do ^{15}N nas Raízes de Soja em Crescimento

Os dados de enriquecimento de ^{15}N das diferentes categorias de raízes das plantas mostraram uniformidade na marcação aos 10 e 14 dias após o fornecimento de ^{15}N através das folhas, tanto para ureia quanto para a glutamina (Figura 10). Aos 47 DAM as raízes marcadas com glutamina continuaram uniformes e, em contrapartida as raízes marcadas com ureia apresentaram diferenças significativas entre as diferentes categorias, indicando que a partir dos 47 DAM não houve uniformidade de marcação dessas raízes. Além da falta de homogeneidade de marcação no sistema radicular, existe uma diminuição de enriquecimento de ^{15}N ao longo do tempo (observando a partir dos 14 DAM), claramente observada em todas as partes das raízes (Figura 10). Essa redução foi proporcional entre os diferentes segmentos radiculares, exceto para raiz principal no tratamento com glutamina.

KHAN et al. (2002a) atribuíram a diferença de marcação dentro da planta, encontrada em outras leguminosas, à diluição do ^{15}N ocorrida na coroa radicular, região de maior concentração de nódulos, devido a fixação de N_2 atmosférico. Araújo (2004) atribui essa diferença à falta de uma perfeita redistribuição do ^{15}N para as raízes mais jovens.

A diferença de enriquecimento de ^{15}N entre a raiz primária e as raízes finas, aos 70 DAM com ureia foi de 70%, enquanto que as raízes marcadas com glutamina apresentaram uma diferença em torno de 59%. Dependendo da fração de raiz considerada como referência, por apresentar diferença de marcação, encontra-se diferentes valores de NRNR. Diversos estudos, por essa razão, utilizaram como referência, o enriquecimento médio ponderado encontrado nas raízes (MCNEILL et al, 1997; KHAN et al. 2002a, KHAN et al. 2002b). Khan et al. (2002a) assumiram que as raízes recuperadas, por se encontrarem mais próximas da coroa radicular (base da planta), região de maior concentração de nódulos, apresentariam uma marcação inferior à das raízes não recuperadas, provocada pela diluição do ^{15}N no N fixado. Dessa forma, ajustaram o NRNR dividindo o valor encontrado pela razão de enriquecimento entre raízes da coroa (base) e do ápice (extremidade).

Neste estudo, o maior enriquecimento em sua maioria se deu na raiz primária e não nas raízes finas, não sendo, portanto, apropriado a realizar o ajuste proposto por KHAN et al. (2002a).

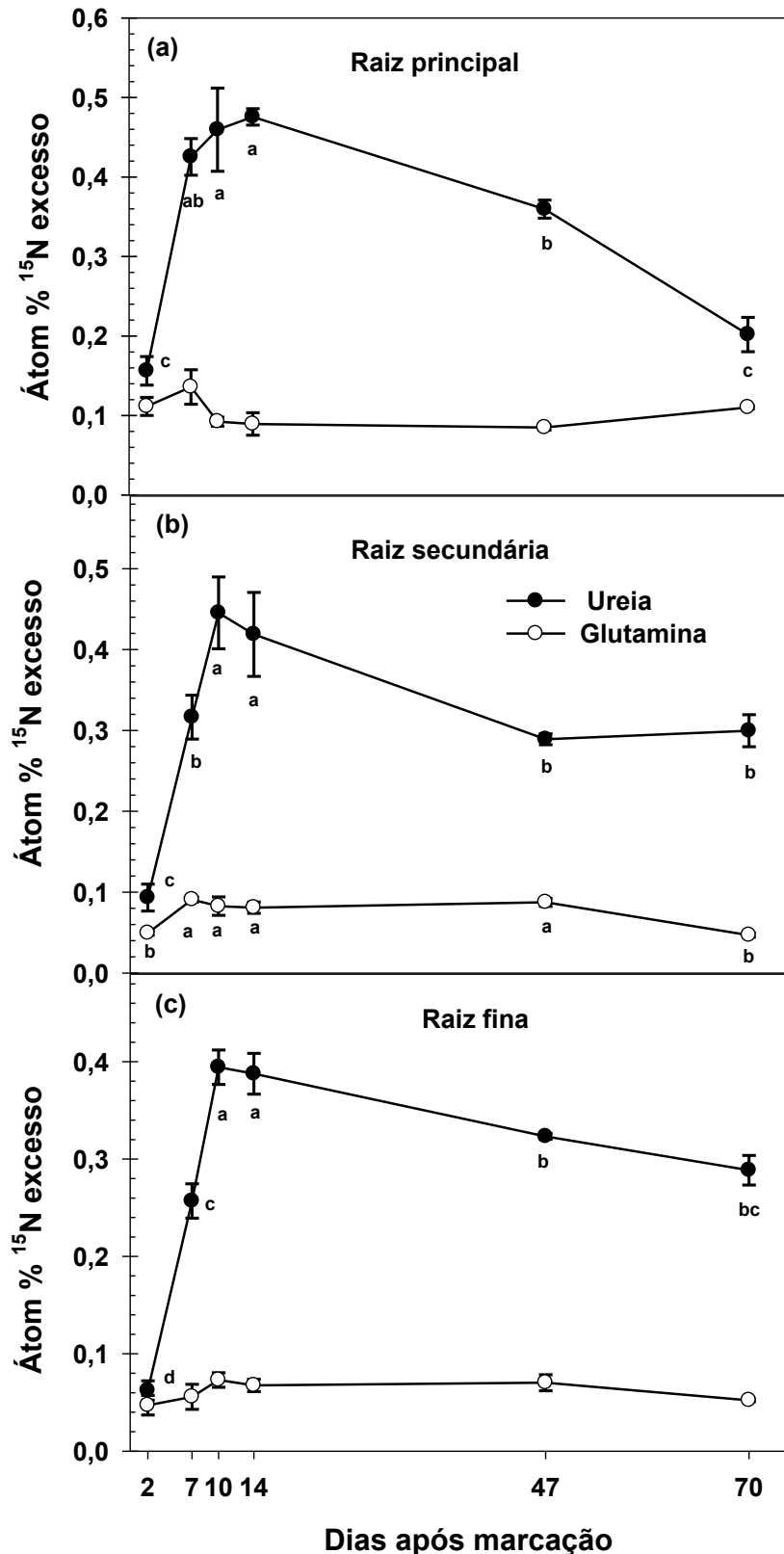


Figura 10. Enriquecimento de ^{15}N em excesso de (a) raízes primárias, (b) secundárias e (c) finas durante as 6 coletas de dias 2, 7, 10, 14, 47 e 70 dias após de marcação da folha com ureia ou glutamina.

A análise de cada categoria de raiz ao longo do tempo, mostrou que a raiz principal, secundária e fina no tratamento com glutamina tiveram marcação tendendo a

ser mais uniforme no enriquecimento de ^{15}N ao longo do tempo. A marcação com a ureia oscila mais que a marcação com glutamina, atingindo um pico máximo com aproximadamente 10 dias após a marcação das plantas (Figura 10). O que sugere que a marcação com glutamina talvez pode ser uma melhor estratégia para marcação das plantas durante os estudos com NRNR, já que a marcação ao longo do tempo com a glutamina tende a ter uma marcação mais uniforme.

Para o total de ^{15}N em excesso recuperado nas raízes (mg ^{15}N excesso por planta), aos 7, 10, 14, 47 e 70 dias após marcação, a raiz principal, a raiz secundária e a raiz fina apresentaram maiores acúmulos de ^{15}N em excesso quando a folha foi marcada com ureia, do que quando foram marcadas com glutamina. A raiz principal e raiz fina tiveram os maiores acúmulos de ^{15}N em excesso (Figura 11). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre as duas fontes no segundo dia após a marcação e nem entre raiz principal, raiz secundária e raiz fina (Tabela AP 1, Apêndice).

O N enriquecido só chegou à raiz principal e raiz fina aos 7 DAM da folha com ureia ou com glutamina (Figura 11). Enquanto na raiz principal e raiz fina o N enriquecido proveniente da ureia permaneceu até os 47 DAM, o N enriquecido proveniente da glutamina aparentemente permaneceu até os 70 DAM. De fato, no solo os maiores acúmulos de N proveniente da ureia foram observados entre 47 e 70 DAM da folha, se destacando a ureia quando comparado à glutamina (Tabela 6). Estes dados indicam que a exsudação de N pelas raízes ocorre mais precocemente quando se utiliza a ureia como fonte de marcação.

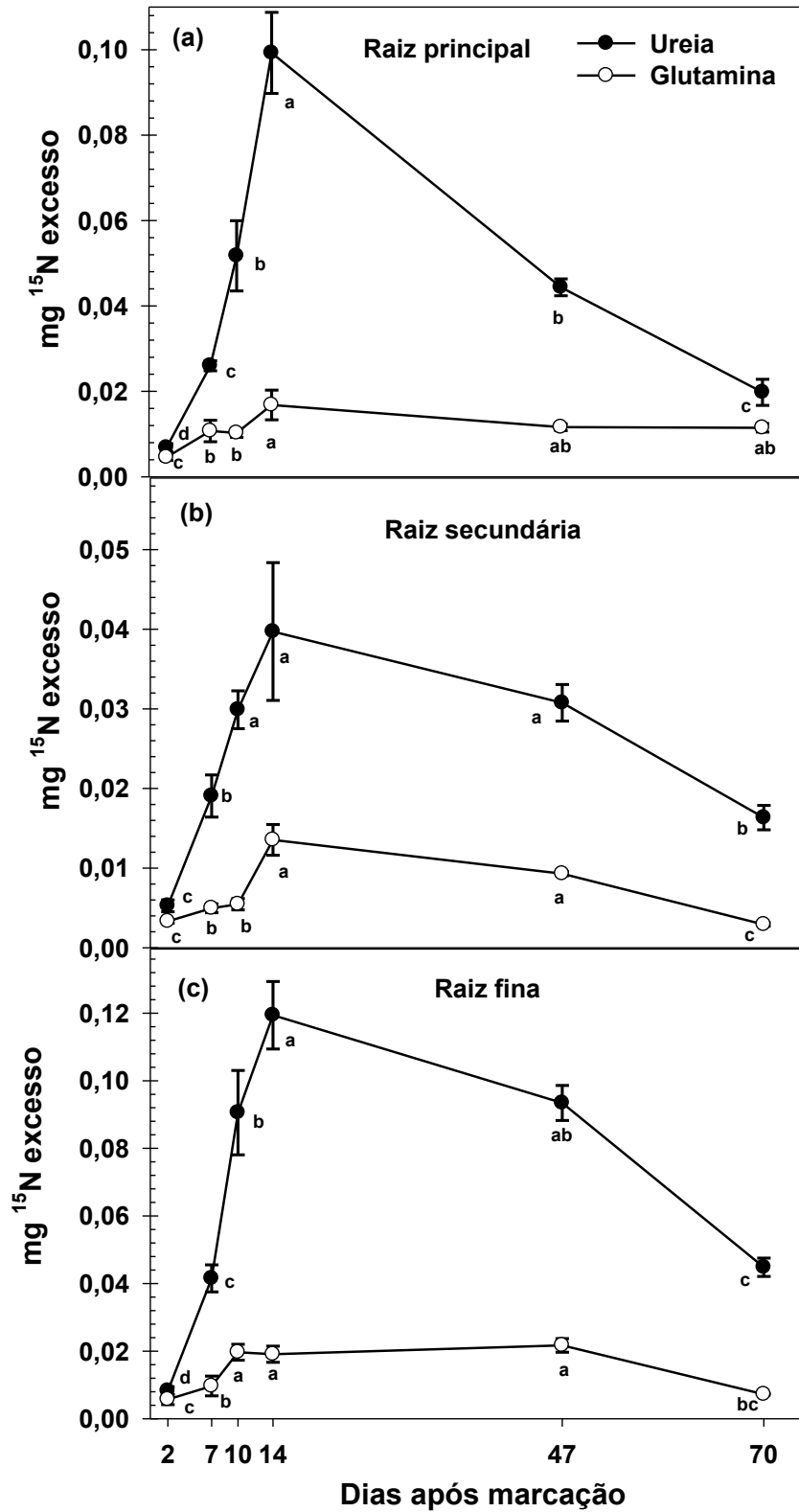


Figura 11. Total ¹⁵N em excesso (mg por planta) recuperado pelas (a) raízes primárias, (b) secundárias e (c) finas durante as 6 coletas de dias 2, 7, 10, 14, 47 e 70 dias após de marcação da folha com ureia ou glutamina.

Tabela 6. Enriquecimento com ^{15}N (% átomos ^{15}N excesso) e ^{15}N no solo rizosférico e solo total (mg ^{15}N excesso vaso $^{-1}$), marcados com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.

Dias Após Marcação	Solo Rizosférico		Solo	
	Ureia	*Gln	Ureia	*Gln
	átomos		% 15N excesso	
2	0,0381 c	0,0220 a	0,0011 d	^{ns} 0,0008
7	0,0756 a	0,0215 a	0,0016 c	0,0007
10	0,0663 a	0,0151 b	0,0016 c	0,0004
14	0,0476 bc	0,0135 b	0,0015 c	0,0006
47	0,0590 ab	0,0157 b	0,0022 b	0,0008
70	0,0255 d	0,0090 c	0,0028 a	0,0007
Média	0,0520	0,0161	0,0018	0,0007
CV (%)	3,4		24,5	
	átomos ^{15}N excesso (mg)			
2	0,0014 b	0,0008 ab	0,0899 d	0,0579
7	0,0046 a	0,0011 ab	0,1326 c	0,0523
10	0,0040 a	0,0008 ab	0,1371 c	0,0361
14	0,0033 a	0,0011 a	0,1380 c	0,0556
47	0,0017 b	0,0005 b	0,1861 b	0,0613
70	0,0040 a	0,0008 ab	0,2703 a	0,0677
Média	0,0032	0,0009	0,1590	0,0551
CV (%)	2,8		24,6	

Valores médios de 5 repetições. Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade. ^{ns} não significativo. *glutamina.

Em sistemas não estéreis a presença da enzima urease sempre promove a rápida hidrólise de ureia para amônio (NH_4^+) (LANA et. al., 2010).

Vários estudos demonstram que o NH_4^+ pode ser tóxico para as plantas, e é possível que logo após a aplicação da ureia o maior acúmulo de N no solo derivado da ureia aplicada tenha um movimento preferencial a ser excretado. Britto et al. (2001), trabalhando com arroz, uma planta mais tolerante ao NH_4^+ e a cevada, mais sensível, identificaram na cevada um mecanismo de exsudação ativa de NH_4^+ e que a cevada acumula concentrações excepcionalmente elevadas de NH_4^+ no citossol. Parte deste NH_4^+ sofreria, então, o efluxo contra a tendência termodinâmica dominante, que seria de fora para dentro. O resultado desse processo seria um gasto excessivo de energia, com efeitos negativos sobre o metabolismo da planta. O arroz, entretanto, mostra um eficiente sistema de controle do potencial da membrana e, conseqüentemente acumula concentrações menores de NH_4^+ no citossol (WANG et al., 1994; BRITTO et al., 2001), bem como concentrações mínimas de exsudação de NH_4^+ .

4.3 Diluição do ^{15}N nas Folhas de Soja em Crescimento

Os dados de enriquecimento de ^{15}N dos diferentes segmentos de parte aérea das plantas mostraram que não houve uniformidade na marcação entre as partes da planta. Para as coletas realizadas aos 2, 7, 10 DAM, os resultados demonstraram que o folíolo marcado remobilizou (1° trifólio) o ^{15}N para o caule e a partir do caule, houve a

remobilização do ^{15}N para as demais folhas, de forma decrescente (1º a 6º trifólio) (Tabela 7). No geral, observa-se que as plantas marcadas com glutamina apresentaram uma marcação mais lenta, ao longo do crescimento da planta; o contrário foi visto nas plantas marcadas com ureia. Aos 14 DAM, as duas fontes de marcação apresentaram um enriquecimento uniforme, não apresentando diferenças significativas entre as partes das plantas (Tabela 7). Yasmin et al. (2010) em um trabalho realizado com grão de bico, usando como fonte de ^{15}N ureia, mostraram que não houve diferença entre os valores átomos ^{15}N em excesso nas folhas e caule, as 135 DAM da folha. Gasser et al. (2015) em um trabalho com trevo, mostraram que após a translocação inicial de N marcado a curto prazo, observaram a mais longo prazo uma translocação relativamente lenta, atribuiu a isso enriquecimento das raízes ao longo do tempo.

Tabela 7. Átomos % ^{15}N excesso e ^{15}N Planta ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta $^{-1}$) em diferentes partes da parte aérea de soja, marcadas com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.

Parte da Planta	átomos % ^{15}N excesso		átomos ^{15}N excesso (mg)	
	Ureia	Gln	Ureia	Gln
2 Dias Após Marcação				
Caule	0,2506 a	0,1491 a	0,0495	0,0301
1ª Trifólio	0,1807 b	0,1552 a	0,0227	0,0202
2ª Trifólio	0,0763 c	0,0462 b	0,0223	0,0130
3ª Trifólio	0,0518 d	0,0273 c	0,0174	0,0098
4ª Trifólio	0,0311 e	0,0220 d	0,0023	0,0018
Média	0,1692	0,1168	0,0315	0,0211
CV (%)	1,9		2,0	
7 Dias Após Marcação				
Caule	0,5853 a	0,1943 a	0,2436 a	0,0824 a
1ª Trifólio	0,6788 a	0,2120 a	0,2760 a	0,0870 a
2ª Trifólio	0,4483 b	0,1809 a	0,2095 a	0,0713 a
3ª Trifólio	0,2071 c	0,0864 b	0,1154 b	0,0476 b
4ª Trifólio	0,3989 b	0,0830 b	0,2511 a	0,0483 b
5ª Trifólio	0,1694 d	0,0488 c	0,0314 c	0,0066 c
Média	0,4392 A	0,1227 B	0,2923 A	0,0374 B
CV (%)	0,7		3,6	
10 Dias Após Marcação				
Caule	0,7104 b	0,1385 a	0,2981 b	0,0553 bc
1ª Trifólio	0,7702 a	0,1369 ab	0,0360 e	0,0067 e
2ª Trifólio	0,6503 c	0,1103 bc	0,1316 d	0,0281 d
3ª Trifólio	0,5293 d	0,1388 a	0,1897 c	0,0500 c
4ª Trifólio	0,4674 e	0,1042 c	0,2277 c	0,0655 ab
5ª Trifólio	0,5419 d	0,0915 d	0,4096 a	0,0814 a
6ª Trifólio	0,2394 f	0,0425 e	0,0379 e	0,0066 e
Média	0,4719	0,1158	0,4125	0,0363
CV (%)	5,7		4,0	
14 Dias Após Marcação				
Caule	0,6225	0,1463	0,3548 b	0,0848 b
1ª Trifólio	0,4169	0,0874	0,0651 d	0,0151 d
2ª Trifólio	0,4233	0,1025	0,1838 c	0,0452 c
3ª Trifólio	0,4613	0,1101	0,3067 b	0,0669 b
4ª Trifólio	0,4591	0,1033	0,3715 b	0,0850 b
5ª Trifólio	0,6238	0,1544	0,6842 a	0,1849 a
6ª Trifólio	0,4119	0,0867	0,0406 e	0,0110 d
Média	0,4766	0,1099	0,2564	0,0594
CV (%)	1,1		2,0	

Valores médios de 5 repetições. Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

Analisando cada fragmento de parte aérea ao longo do tempo, é evidente que todas as folhas e caule tendem a ficar mais uniformes ao longo do tempo nos tratamentos com ureia e glutamina. A planta marcada com ureia tende a translocar mais rapidamente o N enriquecido para parte inferior da planta.

A Tabela 9, mostra os dados de ^{15}N da parte aérea inteira de todas as coletas (2, 7, 10, 14, 47 e 70 DAM) e pode-se observar que a marcação das plantas com ureia e glutamina tende a ficar mais uniforme com o passar do tempo a partir da segunda coleta.

Tabela 8. Enriquecimento com ^{15}N (% átomos ^{15}N excesso) e a quantidade de ^{15}N em excesso ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta $^{-1}$) em diferentes partes da parte aérea de soja, marcadas com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.

Dias Após Marcação	1ª Trifólio		2ª Trifólio		3ª Trifólio	
	Ureia	Gln	Ureia	Gln	Ureia	Gln
	atom % ^{15}N excesso					
2	0,1807 c	0,1552 b	0,0763 c	0,0462 b	0,0518 c	0,0273 b
7	0,6788 a	0,2120 a	0,4483 b	0,1809 a	0,2071 b	0,0864 a
10	0,7702 a	0,1369 b	0,6503 a	0,1103 ab	0,5293 a	0,1388 a
14	0,4169 b	0,0874 c	0,4233 b	0,1025 ab	0,4613 a	0,1101 a
Média	0,5117	0,1479	0,3995	0,1100	0,3124	0,0907
CV (%)	17,3		20,0		1,3	
	4ª Trifólio		5ª Trifólio		6ª Trifólio	
2	0,0311 b	0,0220 b	-	-	-	-
7	0,3989 a	0,0830 a	0,1694 b	0,0488 b	-	-
10	0,4674 a	0,1042 a	0,5419 a	0,0915 b	0,2394 a	0,0425 a
14	0,4591 a	0,1033 a	0,6238 a	0,1544 a	0,2719 a	0,0667 a
Média	0,3391	0,0781	0,4450	0,0982	0,2557	0,0546
CV (%)	4,9		6,4		3,5	
	Caule					
2	0,2506 c	0,1491 b	-	-	-	-
7	0,5853 b	0,1943 a	-	-	-	-
10	0,7104 a	0,1385 b	-	-	-	-
14	0,6225 ab	0,1463 b	-	-	-	-
Média	0,5422	0,1571				
CV (%)	0,03					
	atom ^{15}N excesso (mg)					
	1ª Trifólio		2ª Trifólio		3ª Trifólio	
2	0,0227	0,0202	0,0223 d	0,0130 c	0,0174 c	0,0098 c
7	0,2760	0,0870	0,2095 b	0,0713 a	0,1154 b	0,0476 b
10	0,0360	0,0067	0,1316 c	0,0281 b	0,1897 b	0,0500 a
14	0,0651	0,0151	0,1838 c	0,0452 ab	0,3067 a	0,0669 a
Média	0,1000	0,0322	0,1368	0,0394	0,1573	0,0436
CV (%)	37,6		22,6		10,8	
	4ª Trifólio		5ª Trifólio		6ª Trifólio	
2	0,0023 c	0,0018 b				
7	0,2511 b	0,0483 ab	0,0314 c	0,0066 b		
10	0,2277 b	0,0655 a	0,4096 a	0,0814 a	0,0379	0,0066 b
14	0,3715 a	0,0850 a	0,6842 a	0,1849 a	0,0406	0,0110 a
Média	0,2132	0,0501	0,3750	0,0909	0,0393	0,0088
CV (%)	18,9		21,6		13,6	
	Caule					
2	0,0495 c	0,0301 c	-	-	-	-
7	0,2436 b	0,0824 a	-	-	-	-
10	0,2981 a	0,0553 b	-	-	-	-
14	0,3548 a	0,0848 a	-	-	-	-
Média	0,2365	0,0631				
CV (%)	2,1					

Valores médios de 5 repetições. Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

Tabela 9. Enriquecimento com ^{15}N (% átomos ^{15}N excesso) e a quantidade de ^{15}N em excesso ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta $^{-1}$) na parte aérea de soja, marcadas com ^{15}N -ureia e ^{15}N -glutamina, em seis épocas de coleta.

Dias Após Marcação	Parte Aérea							
	Ureia		Gln					
	átomos ^{15}N	% excesso	átomos ^{15}N	excesso (mg)				
2	0,1181	e	0,0800	b	0,0228	d	0,0150	d
7	0,4976	c	0,1611	a	0,2254	c	0,0689	c
10	0,7818	a	0,1525	a	0,2661	c	0,0587	c
14	0,6558	b	0,1541	a	0,4013	b	0,0986	b
47	0,2992	d	0,0875	b	1,5425	a	0,4444	a
70	0,2151	d	0,0662	c	1,5261	a	0,4925	a
Média	0,4279		0,1169		0,6640		0,1964	
CV (%)	6,1		4,6					

Valores médios de 5 repetições. Letras minúsculas iguais na coluna, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

A ureia ao ser absorvida pela folha é quebrada em amônio (NH_4^+) e CO_2 pela ação da uréase, o que permite a glutamina sintetase (GS) juntar o NH_4^+ ao glutamato e produzir a glutamina. A glutamato sintase, também conhecida como GOGAT – 2-oxoglutarato aminotransferase – transfere um grupo amino da glutamina para o α -cetoglutarato (ou oxoglutarato) e forma dois glutamatos. Um dos glutamatos é exportado para as reações de transaminação (formação de outros aminoácidos), enquanto o outro glutamato regenera o ciclo GS-GOGAT.

Portanto o NH_4^+ derivado da ureia é precocemente exsudado, porque ele exige muito do processo fotossintético através da demanda de energia (ATP), poder redutor (ferredoxina) e esqueletos de carbono para que ocorra a sua assimilação em esqueletos de carbono, uma vez que é um composto fitotóxico na sua forma iônica que não pode ser armazenado nos tecidos vegetais. Ao contrário da ureia, o glutamato participa de reações de transaminação e crescimento da planta através da formação de proteínas na parte aérea e sistema radicular da planta.

Após a absorção dos aminoácidos via simporte com próton, na raiz, estes são exportados através do xilema para parte aérea para construir proteínas, ácidos nucleicos e outros constituintes da planta necessários para o crescimento e produtividade da cultura (YONEYAMA et al., 1986; YONEYAMA et al., 2003). A exportação de aminoácidos e amidas de órgãos maduros da parte aérea via floema para as raízes (particularmente o ápice radicular em crescimento) também ocorre visando sintetizar proteínas para o seu crescimento da raiz (TATSUMI & KONO, 1980).

4.4 Nitrogênio nas Raízes Não Recuperado (NRNR)

O NRNR (mg) do solo rizosférico (NRNR_{SR}) não apresentou diferença entre as fontes de marcação (ureia e glutamina), e nem ao longo das coletas (Tabela 10). Vale ressaltar que os fragmentos de raízes que permaneceram no solo rizosférico após a liofilização das raízes, foram na sua maioria retirados, através do peneiramento desse solo (com gase), com o objetivo de deixar esse solo rizosférico o mais “limpo” possível, para que os fragmentos de raízes não interferissem no real valor do NRNR_{SR} . Araújo (2004) encontrou valores de NRNR do solo rizosférico variando de 2,5 mg a 66 mg, ao longo do tempo, valores superiores aos encontrados no presente estudo. O autor relata

que houve esses aumentos devido ao maior peso do solo rizosférico (8 - 38 g), que acrescido de 8g para 38 g, se deveu ao fato que na última coleta houve maior fragmentação das raízes finas, misturando-se ao solo que dificultou a total separação das raízes do solo, favorecendo o aumento do solo rizosférico e da quantidade de fragmentos radiculares nesse solo, o que levou o aumento do NRNR_{SR}.

O NRNR do solo (NRNR_s) apresentou diferença ao longo do tempo e, entre as fontes de marcação, apresentou maiores valores quando a fonte de marcação foi a glutamina. Estes resultados indicam que as maiores proporções de N estão presentes no solo, e apenas uma pequena porção presente no solo rizosférico, isto porque a quantidade de solo rizosférico (2 - 7g) é muito menor que a quantidade total de solo (6 kg). A partir dos 10 DAM essa quantidade de N presente no solo praticamente estabiliza-se, mostrando que o NRNR pode ser considerado a partir dos 10 DAM da planta.

Quanto as contribuições do NRNR total (mg N planta⁻¹), observou-se que aos 2 DAM houve uma grande exsudação de N, de 163 mg e 141 mg por planta, para os tratamentos de ureia e glutamina, respectivamente (Tabela 11). O mesmo foi relatado por Gasser et al. (2015), em estudo feito com trevo. Entretanto, esta importante observação não foi observada por outros autores por não ter realizado colheitas poucos dias após a marcação (WICHERN et al., 2008). Ao longo das demais coletas há a diminuição do NRNR do solo. A melhor explicação para esta diminuição de incremento no NRNR após a primeira coleta seja a reabsorção do N excretado devido à alta demanda de N pela cultura da soja, como mencionado por JANZEN (1990).

Tabela 10. Estimativas do N das raízes não recuperável (NRNR) no solo rizosférico e no solo.

Dias Após Marcação	NRNR Solo Rizosférico		NRNR Solo (mg)	
	(mg N planta ⁻¹)		(mg N planta ⁻¹)	
	Ureia	Gln	Ureia	Gln
2	^{ns} 2,72	1,79	161 a	139 a
7	1,87	2,49	52 bcB	112 aA
10	1,02	1,17	34 d	48 b
14	0,86	1,75	36 cdB	85 aA
47	0,54	0,8	57 b	86 a
70	1,42	1,64	95 a	131 a
Média	1,4	1,61	73	100
CV (%)	14,5		10,9	

Valores médios de 5 repetições. Letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

^{ns} não significativo.

Tabela 11. Estimativas do total N das raízes não recuperável (NRNR) no solo rizosférico e no solo em mg N planta⁻¹ e como porcentagem do N total da planta.

Dias Após Marcação	NRNR (mg N planta ⁻¹)		NRNR (%)	
	Ureia	Gln	Ureia	Gln
2	163 a	141 a	54 a	50 a
7	54 bB	114 aA	15 bB	28 bA
10	35 c	50 b	10 c	13 c
14	37 cB	87 aA	7 dB	15 cA
47	58 bB	87 aA	8 cdB	12 cA
70	97 a	132 a	11 bc	14 c
Média	74,04 B	101,85 A	17,76 B	21,97 A
CV (%)	11,7		9,5	

Valores médios de 5 repetições. Letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade.

Em estudo feito por JANZEN, (1990) com trigo, cultivado em solo com baixa disponibilidade de N, 18% do N assimilado foi liberado para o solo rizosférico. Em contrapartida, quando houve uma maior disponibilidade de N, o N depositado no solo rizosférico foi 33% do N total assimilado. Isso mostra que a quantidade de N depositada na rizosfera e/ou solo durante o desenvolvimento da planta parece estar associada à oferta de N à cultura (JANZEN, 1990). Cooper et al. (1986) afirma que quanto maior seja a quantidade de N na parte aérea da planta, favorece maior translocação de N para raiz conforme observado neste estudo (Figura 7).

A partir dos 10 DAM das plantas, o NRNR começou a estabilizar, para as duas fontes de N utilizadas para marcação foliar. A diminuição do acúmulo de N total na raiz e nódulo, como pode ser visto na Figura 7, em torno de 87 mg e 82 mg, para ureia e glutamina, respectivamente, é muito semelhante às estimativas de NRNR do solo (Tabela 11).

Para o NRNR (%) foi visto que para as duas fontes de marcação a partir dos 10 DAM das plantas, praticamente não apresentou diferenças, e ainda, a partir daí o NRNR se manteve uniforme, variando de 8 a 15% do N acumulado pela planta inteira, valores relativamente baixos quando comparados aos relatados da literatura.

ROCHESTER et al. (1998) estimaram que o total de N no sistema radicular da soja representaria entre 39 e 41% do total de N acumulado pela planta inteira, Já Araújo et al. (2004) encontraram valores de NRNR em torno de 16%, ambos trabalhando com soja. Yasmin et al. (2010) estimou que o NRNR em grão de bico foi em torno de 32%, semelhante aos estimados para ervilha 33% e 29% (WICHERN et al, 2007a, 2007b). Estudo feito por KHAN et al. (2002, 2003), estudando também grão de bico, encontrou valores de NRNR de 55% e 68%. Diversos estudos realizados com diferentes culturas, como feijão fava, tremoço, trevo, serradela e ervilha encontraram valores de NRNR variando em torno de 11% a 30% (KHAN et al, 2002b; McNEILL et al, 1997; RUSSELL e FILLERY, 1996; MAYER et al., 2003; SCHMIDTKE, 2005a).

A utilização de colheitas sequenciais permite a avaliação do acúmulo de N enriquecido no solo proveniente das folhas marcadas. Neste estudo inédito, mostramos que inicialmente (até 2 DAM) houve uma exsudação do N enriquecido. Esta exsudação deve ser como resultado do “trauma” do processo de cortar a folha e a exposição de solução de uma fonte de N solúvel, e já foi observado por Gasser et al. (2015). Em

seguida (entre dias 2 a 10) a quantidade do N enriquecido no solo diminuiu. A mais lógica explicação deste desaparecimento do N enriquecido seja a re-absorção pelas raízes. Neste momento (10 DAM) é difícil imaginar que esta quantidade do N presente (35 e 50 mg N por planta) foi resultado da senescência das raízes. Entretanto, o subsequente aumento do N enriquecido no solo deve representar N derivado da senescência e exsudação do N semelhante em plantas não tratadas com N enriquecido. Em outras palavras, há grande probabilidade de que este N depositado após o 10 DAM (após a re-absorção do N exsudado) seja o verdadeiro NRNR, o N perdido da planta que é impossível recuperar pela coleta de raízes. O fato é que as duas estimativas do NRNR derivado, da marcação com ureia ou glutamina reforçam esta hipótese.

5 CONCLUSÃO

- i) A marcação da planta com ^{15}N , através da folha, com a glutamina, se mostrou mais uniforme para todas as partes da planta (raiz e parte aérea), comparado com uso de ^{15}N -ureia.;
- ii) A utilização de colheitas sequenciais da planta inteira permitiu a avaliação da dinâmica do acúmulo do N enriquecido com ^{15}N no solo proveniente da planta marcada com ^{15}N .
- iii) Ao longo das coletas o aumento do N enriquecido no solo, na fase final de crescimento das plantas, deve representar o N derivado da senescência e exsudação do N, o que pode ser considerado como o verdadeiro valor do N radicular não recuperado (NRNR).
- iv) No balanço do N total da planta inteira de soja, entre 8 e 15% do total de N acumulado pela planta inteira encontra-se no solo na fase de maturação da planta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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, RJ. 1996. 150p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Transformações do nitrogênio em rotações de culturas sob sistema plantio direto. In: Workshop nitrogênio na sustentabilidade de sistemas intensivos de produção agropecuária, 2000, Dourados, MS. **Anais...** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. p. 9-31. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 26; Embrapa Agrobiologia. Documentos, 128). Editado por Fábio Martins Mercante.

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Soybean benefit to a subsequent wheat cropping system under zero tillage. **Nuclear Techniques in Integrated Plant Nutrient, Water and Soil Management**. Vienna: IAEA, 2002. p. 87-93.

ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, v. 252, n.1, p. 1-9, 2003.

ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F. M.; HECKLER, J. C.; MACEDO, R. A. T.; BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de N em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n.3, p. 449-456, 2006.

ALCANTARA, R. M. C. M.; REIS, V. M. **Metabolismo do Carbono nos Nódulos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. (Documentos n. 253).

AMADO, T. J. C.; SCHLEINDWEIN, J. A.; FIORIN, J. E. Manejo do solo visando à obtenção de elevados rendimentos de soja sob sistema plantio direto. In: THOMAS, A. L.; COSTA, J. A. (Org.). **Soja: manejo para alta produtividade de grãos**. Porto Alegre: Evangraf, 2010.

ARAÚJO, E. S.; MEDEIROS, A. F. A.; DIAS, F. C.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Quantificação do n do solo derivado das raízes da soja utilizando o isótopo ¹⁵N. **Revista Universidade Rural**, Série Ciência da Vida. Seropédica, RJ, EDUR, v. 24, n. 1, p. 7-12, jan.- jun., 2004.

ARAÚJO, E. S. **Estimativa da quantidade de n acumulada pelo sistema radicular da soja e sua importância para o balanço de n do solo**. Seropédica, RJ. 2004. 73p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.

ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E. M. S. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Centro de ciências agrárias, comunicado técnico, n. 11, p. 1-4, abril de 2006.

ARAÚJO, K. E. C.; VERGARA, C.; GUIMARÃES, A. P.; ROUWS, J. R. C.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Changes in

¹⁵N natural abundance of biologically fixed N₂ in soybean due to shading, rhizobium strain and plant growth stage. **Plant and Soil**, v. 426, p. 413–428, 2018.

ARNOLD, S. L., SCHEPERS, J. S. A simple roller-mill grinding procedure for plant and soil samples. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 35, p. 537 e 545, 2004.

AYERS, W. A. & THORNTON, R. H. Exudation of amino acids by intact and damaged roots of wheat and peas. **Plant and Soil**, v. 28, p. 193-206, 1968.

BERGERSEN, F. J.; PEOPLES, M. B.; TURNER, G. L. Isotopic discriminations during the accumulation of nitrogen by soybean. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 15, p. 407-420, 1988.

BERGERSEN, F. J.; TURNER, G. L.; GAULT, R. R.; PEOPLES, M. B.; MORTHORPE, L. J.; BROCKWELL, J. Contributions of nitrogen in soybean crop residues to subsequent crops and to soils. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.43, n.1, p.155-169, 1992.

BODDEY, R. M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 6, p. 209-266, 1987.

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

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas utilizando o isótopo ¹⁵N. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos em estudo de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1994, p. 471-494.

BODDEY, R. M.; SÁ, J. C. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agriculture systems in the tropics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, p. 787-799, 1997.

BODDEY, R. M.; JANTALIA, C. P.; ZANATTA, J. A.; CONCEIÇÃO, P. C.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; DIECKOW, J.; DOS SANTOS, H. P.; DENARDIN, J. E.; AITA, C.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Carbon accumulation at depth in Ferralsols under zero-till subtropical agriculture in southern Brazil. **Global Change Biology**, v.16, p.784-795, 2010.

BLACK, A. S.; WARING, S. A. The natural abundance of ¹⁵N in the soil water system of a small catchment area. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 209-266, 1977.

BRITO, D. T.; GLASS, A. D. M.; KRONZUCKER, H. J. & SIDDIQI, M. Y. Cytosolic concentration and transmembrane fluxes of NH₄⁺/ NH₃⁻ an evaluation of recent proposals. **Plant Physiology**, v. 125, p. 523-526, 2001.

- BURRIS, R. H. **The acetylene reduction technique.** In: STEWART, D.P. **Nitrogen fixation by free-living microorganisms**, Cambridge: Cambridge University Press, 1975. p. 249-258 (International Biological Program, 6).
- CAMARGO, F. A, de O., GIANELLO, C., VIDOR, C. Nitrogen fractions in the microbial biomass in soils of southern Brazil. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 180-185, 1999.
- CARNEIRO, G. E. S.; PÍPOLO, E. A.; MELO, C. L. P.; LIMA, D.; FOLONI, J. S. S.; MIRANDA, L. C.; PETEK, M. R.; BORGES, R. S. **Cultivares de soja: macrorregiões 1,2,3 Centro-sul do Brasil.** 1.ed. Embrapa, Londrina, PR, 2014.
- CAVASSIM, J. E. **Classificação em grupos de maturidade relativa para a soja comparando metodologias de estabilidade.** Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- CHENG, H. H.; BREMNER, J. M.; EDWARDS, A. P. Variations of-nitrogen-15 abundance in soils. **Science**, v. 146, p. 1574-1575, 1964.
- COBER, E. R. Long Juvenile Soybean Flowering Responses under Very Short Photoperiods. **Crop Science**, v. 51, p. 140–145, 2011.
- CORREIA, W. R.; HAMAWAKI, O. T.; LÉLLIS, M. M.; RERZENDE, D. F. Adaptabilidade e estabilidade de genótipos de soja em Minas Gerais. **Bioscience Journal**, v. 24, p. 80-85, 2008.
- DELAMUTA J. R. R.; RIBEIRO R. A.; ORMEÑO-ORRILHO E.; MELO I. S.; MARTÍNEZ-ROMERO E.; HUNGRIA M. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* Group I a strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp.**International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 3342–3351, nov. 2013.
- DELWICHE, C. C. E STEYN P. L. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. **Environmental Science & Technology**, v. 4, p. 929-935, 1970.
- DIEKOW, J.; MIELNICZUK, J.; KNICKER, H.; BAYER, C.; DICK, D. P.; KOGELKNABNER, I. Carbon and nitrogen stocks in physical fractions of a subtropical Acrisol as influenced by long-term no-till cropping systems and N fertilisation. **Plant and Soil**, v. 268, p. 319-328, 2005.
- DOMENACH, A. M.; CHALAMET, A. Rapports isotopiques naturels de l'azote. I. Premiers resultats: sols de Dombes. **Revue d'Écologie et de Biogie du Sol**, v. 14, p. 279–287, 1977.
- DUCATTI, C. Isótopos Estáveis Ambientais. Botucatu: Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, 2007. p. 205, **(Apostila)**.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **A cultura da soja no Brasil.** Londrina: Embrapa Soja, 2000. p. 179.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. 2.ed. Massachussets: Sinauer, 2005. p. 380.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLIL, D.; SIMON, J.; DOURADO NETO, D.; LIER, Q. J. V; SANTOS, O. S.; MULLER, L. Fisiologia da fixação biológica de nitrogênio em soja – revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FARIAS, J. R. B.; NEPOMUCENO, A. L.; NEUMAIER, N. **Ecofisiologia da soja**. Circular técnica 48. Londrina, PR: Embrapa, 2007.

FARIAS, J. R. B. **Limitações climáticas à obtenção de rendimentos máximos de soja**. Quinto Congresso de la Soja del Mercosur-Mercosoja 2011. Workshops. Rosário, Argentina: 2011.

FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E. **Stages of soybean development**. Spec. Rep. 80. Ames, IA: Iowa State University, 1977.

FREIRE, J. R. J.; VERNETTI, F. J. A. A. A pesquisa com a soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculante no Brasil. **Pesquisa Agropécuaria Gaúcha**, Porto Alegre, v. 5, p. 1-25, 1999.

GASSER, M.; HAMMELEHLE, A.; OBERSON, A.; FROSSARD, E. Quantitative evidence for overestimated rhizodeposition using ^{15}N -leaf labelling. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 85, p. 10-20, 2015.

GLIESSMAN, S. R. Agroecologia: **processos ecológicos em agricultura sustentável**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p. 653, 2000.

GUIMARÃES, A.P. **Determinação do coeficiente isotópico do ^{15}N relacionado ao processo de fixação biológica de nitrogênio em soja** 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

GUIMARÃES, A. P.; DE MORAIS, R. F.; URQUIAGA S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. *Bradyrhizobium* strain and the ^{15}N natural abundance quantification of biological N_2 fixation in soybean. **Scientia Agricola**, v. 65, p. 516-524, 2008.

HALL, A. E. **Crop responses to environment**. CRC Press LLC: Boca Raton, Florida. p. 228, 2001.

HARADA, A. **Florescimento e período juvenil longo em soja como fator de adaptação da cultura às regiões de baixas latitudes**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

HERRIDGE, D. F. & PEOPLES M. B. Ureide assay for measuring nitrogen fixation by nodulated soybean calibrated by ^{15}N methods. **Plant Physiology**, v.93, p. 495-503, 1990.

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

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; BALOTA, E. L.; COLOZZI FILHO, A. A **importância do sistema de semeadura direta na população microbiana do solo**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1997, p. 9 (EMBRAPA-CNPSo. Comunicado Técnico, 56).

HUNGRIA, M. & VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, v. 65, p. 151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: Werner D, Newton WE, editors. **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. Dordrecht: Springer, p. 25-42, 2005.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of grain crops in the tropics: The success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R.P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P.K., ed. **Nitrogen Nutrition in Plant Productivity**. Houston, TX, USA: Studium Press, 2006a. p. 43-93.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; CRISPINO, C. C.; MORAES, F. L.; SIBALDELLI, R. N. R.; MENDES, I. C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, p. 927-939, 2006.

IBGE-SIDRA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. 2019. Disponível no: <https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>

IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change 2006. Guidelines for National Greenhouse Gas Inventories. In: Greenhouse Gas Inventory Reference Manual, v. 4. Disponível no: <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/vol4.html>

JANZEN, H. H. & BRUINSMA, Y. Methodology for the quantification of root and rhizosphere nitrogen dynamics by exposure of shoots to ¹⁵N-labelled ammonia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 21, n. 2, p. 189-196, 1989.

JENSEN, E. S. Rhizodeposition of N by pea and barley and its effect on soil N dynamics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 1, p. 65-71, 1996.

JUNK, G.; SVEC, H. J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 14, p. 234-243, 1958.

KANTOLIC, A. G. Control ambiental y genético de la fenología del cultivo de soja: impactos sobre el rendimiento y la adaptación de genótipos. **Revista da Faculdade de Agronomía UBA**, v. 28, p. 63-88. 2008.

KASTER, M.; FARIAS, J. R. B. **Regionalização dos testes de Valor de Cultivo e Uso e da indicação de cultivares de soja – Terceira Aproximação**. Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 69, (Documentos, 330).

KHAN, D. F.; PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F. Quantifying below-ground

nitrogen of legumes. 1. Optimising procedures for ^{15}N shoot-labelling. **Plant and Soil**, v. 245, p. 327-334, 2002a.

KHAN, D. F.; PEOPLES, M. B.; CHALK, P. M. & HERRIDGE, D. F. Quantifying below-ground nitrogen of legumes. 2. A comparison of ^{15}N and non isotopic methods. **Plant and Soil**, v. 239, p. 277-289, 2002b.

KHAN, F. D.; PEOPLES, M. B.; SCHWENKE, G. D.; FELTTON, W. L.; CHEN, D. & HERRIDGE, D. F. Effects of below-ground nitrogen on N balances of field-grown fababean, chickpea, and barley. **Australian Journal of Agricultural Research**. v. 54, p.333 – 340, 2003.

LANNA, A. C; SILVEIRA, P. M; SILVA, M. B; FERRARESI, T. M; KLIEMANN, H. J. Atividade de urease no solo com feijoeiro influenciada pela cobertura vegetal e sistemas de plantio. **Revista Brasileira Ciência Solo**, v. 34, p. 1933-1939, 2010.

LAWN, R. J., & BRUN, W. A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. **Crop Science**, v. 14, p. 11-16, 1974.

LONG, S. R.; KAHN, M.; SEEFELDT, L.; TSAY, Y. F.; KOPRIVA, S. Nitrogen and Sulfur. In Buchanan, B. B.; Gruissem, W.; Jones, R.L. (Ed), **Biochemistry and molecular biology of plants**. 2.ed. Rockville: American Society of Plant Physiologists. 2015. p. 1280.

MACEDO, R. A. T. **Influência de fatores de manejo sobre a fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja em áreas experimentais e de produção no Noroeste do Paraná**. 2003. Dissertação (Mestrado em Agronomia, área de Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.

MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; CHAMPIGNY, M. L.; AMARGER, N.; MOYSE, A. Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of NO_3^- by pearl millet. **Plant Physiology**, Rockville, v. 69, p. 880-887, 1982.

MARTINELLI, L. P.; OMETTO, J. P. H. B.; FERRAZ, E. S.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B.; MOREIRA, M. Z. Desvendando Questões Ambientais com Isótopos Estáveis [Unraveling Environmental Issues with Stable Isotopes.]. **Oficina de Textos**, 2009. p.144, São Paulo.

MAYER, J.; BUEGGER, F.; JENSEN, E. S.; SCHLOTTER, M.; HEB, J. Estimating N rhizodeposition of grain legumes using a ^{15}N in situ stem labeling method. **Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 21-28, 2003.

MCAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D. S.; URIBE-ARANGO, H.; WOODHOUSE, W. W. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation of legumes as revealed by ^{15}N . **Agronomy Journal**, v. 50, p. 334-337, 1958.

MCNEILL, A.M.; ZHU, C.; FILLERY, I.R.P. Use of in situ ^{15}N -labelling to estimate the total below-ground nitrogen of pasture legumes in intact soil-plant systems. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 48, p. 295-304, 1997.

MEEKS, J. C.; WOLK, C. P.; SCHILLING, N.; SHAFFER, P. W.; AVISSAR, Y.; CHIEN, W. S. Initial organic products of fixation of (^{13}N) dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*). **Plant Physiology**, Rockville, v. 61, p. 980-987, 1978.

MORRIS, D. R.; ZUBERER, D. A. & WEAVER, R. W. Nitrogen fixation by intact grass-soil cores using ^{15}N and acetylene reduction. **Soil Biology and Biochemistry**. v.17, p. 87-91, 1985.

MUNDSTOCK, C. M.; THOMAS, L. A. **Soja: Fatores que afetam o crescimento e rendimento de grãos**. Porto Alegre, Departamento de plantas de lavouras da UFRG: Evangraf, 2005. p. 31.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, P.; BISSELING, T. Symbiotic Nitrogen Fixation. **The Plant Cell**, v.7, p. 869-885, July 1995.

NOGUEIRA, A. P. O.; SEDIYAMA, T.; BARROS, B. H.; TEIXEIRA, R. C. Morfologia, crescimento e desenvolvimento. In: Sedyama, T. (Ed.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecnas, 2009. p. 7-16.

PACHECO, R. S; BODDEY, R. M; ALVES, B. J. R; STRALIOTTO, R; ARAÚJO, A. P. Growth patterns of common bean cultivars affect the 'B' value required to quantify biological N_2 fixation using the ^{15}N natural abundance technique. **Plant and Soil**, v. 419, p. 293–304, 2017.

PAREDES, D. S.; DINIZ, A. R.; NASCIMENTO, E. C.; URQUIAGA, S.; SOARES, L. H.; BODDEY, R. M. **Comparação entre duas fontes de nitrogênio utilizadas na marcação de folha com ^{15}N para avaliação do N residual subterrâneo da soja**. In: XXVIII Reunião Brasileira de Fertilidade do solo e Nutrição de planta, 2008, Londrina. FERTBIO, 2008.

PAUFERRO, N.; GUIMARÃES, A. P.; JANTALIA, C. P.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; ^{15}N natural abundance of biologically fixed N_2 in soybean is controlled more by the *Bradyrhizobium* strain than by the variety of the host plant. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, p. 1694-1700, 2010.

PAVANELLI, L. E.; ARAÚJO, F. F. D. Fixação biológica de nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens e culturas anuais do oeste paulista. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 21-29, 2009.

PEIXOTO, C. P.; CÂMARA, G. M. S; MARTINS, M.C.; MARCHIORI, L. F. S.; GUERZONI, R. A.; MATTIAZZI, P. Épocas de semeadura e densidade de plantas de soja: I. Componentes da produção e rendimento de grãos. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n.1, p. 89-96, 2000.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989.

PEOPLES, M. B.; CRASWELL, E. T. Biological nitrogen fixation: investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, v. 141, p.13-39, 1992.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, Netherlands, v. 174, p. 3-28, 1995.

PEOPLES, M. B.; GAULT, R. R.; LEAN, B.; SYKES, J. D.; BROCKWELL, J. Nitrogen fixation by soybean in commercial irrigated crops of central and southern New South Wales. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 27, p. 553-561, 1995.

PEOPLES, M. B.; TURNER, G. L.; SHAH, Z.; SHAH, S. H.; ASLAM, M.; ALI, S.; MASKEY, S. L.; BHATTARAI, S.; AFANDI, F.; SCHWENKE, G. D.; HERRIDGE, D. F. Evaluation of the ^{15}N natural abundance technique for measuring N_2 fixation in experimental plots and farmer's fields. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MANAGING LEGUME NITROGEN FIXATION IN CROPPING SYSTEMS OF ASIA, 1997, Hyderabad, Índia. **Proceedings...** Índia: ICRISAT, 1997. p. 57-75. Editores: O. P. Rupela, C. Johansen, D. F. Herridge.

PEOPLES, M. B. & HERRIDGE, D. F. **Quantification of biological nitrogen fixation in agricultural systems**. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NENTON, W.E., (Ed.). Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, 1999. Dordrecht: Kluwer, 2000. p. 519-524.

PENARIOL, A. Soja: cultivares no lugar certo. **Cultivar**. Pelotas, nº 16, maio 2000. p.31-32.

R Development Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available online at: <https://www.Rproject.org/>

RAMOS, M. G.; VILLATORO, M. A. A.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ^{15}N -isotope techniques. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 105-115, 2001.

RAMOS, D. P; CASTRO, A. F de; CAMARGO, M. N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Série Agronomia, v.8, p. 1-127, 1973.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação Biológica de Nitrogênio simbióticas e associativas. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. 1. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 153-174.

RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. p. 26. (Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 165).

RITCHIE, S. W.; HANWAY, J. J.; THOMPSON, H. E.; BENSON, G. O. **How a soybean plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 20p. (Special Report, 53).

RYLE, G. J. A.; POWELL, C. E. and GORDON A. J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea, and white clover. II. Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 145-153, 1979.

ROCHESTER, I. J.; PEOPLES, M. B.; CONSTABLE, G. A.; GAULT, R. R. Faba beans and other legumes add nitrogen to irrigated cotton cropping systems. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 38, n. 3, p. 253-260, 1998.

RUSSELL, C. A. & FILLERY, I. R. P. Estimates of lupin below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 47, p. 1047-1059, 1996a.

RUSSELL, C. A. & FILLERY, I. R. P. Estimates of below-ground biomass nitrogen, dry matter, and nitrogen turnover to wheat. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 47, p. 1047-59, 1996b.

SAWATSKY, N. & SOPER, R. J. A quantitative measurement of the nitrogen loss from the root system of field peas (*Pisum avense* L.) grown in the soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 255-259, 1991.

SCHMIDTKE, K. How to calculate nitrogen rhizodeposition, a case study in estimating N rhizodeposition in the pea (*Pisum sativum* L.) and grasspea (*Lathyrus sativus* L.) using a continuous N-15 labelling split-root technique. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1893–1897, 2005a.

SEDIYAMA, T. (Org.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina, Paraná: Mecenas, 2009. 314 p.

SHEARER G., KOHL D. H. E CHIEN S. H. The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 42, p. 899-905, 1978.

SHEARER G. E.; KOHL D. H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance, **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v, 13, p. 699-756, 1986.

SETIYONO, T. D.; WEISS, A.; SPECHT, J. E.; BASTIDAS, A. M.; CASSMAN, K. G. & DOBERMANN, A. Understanding and modeling the effect of temperature and daylength on soybean phenology under high-yield conditions. **Field Crops Research**, v. 100, p. 257-271, 2007.

SISTI, C. P. J.; SANTOS, H. P. D.; KOCHHANN, R. A.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v. 76, n. 1, p. 39-58, 2004.

SMITH, D. L., HUME, D. J. Comparison of assay methods for N₂ fixation utilizing white bean and soybean. **Canadian Journal Plant Science**, v. 67, p. 11-19, 1987.

SOUTO C. M., ROMANO M. R., URQUIAGA S. & BODDEY, R. M. Acumulação de matéria seca, N, P e K por cana de açúcar (cv. SP 70-1143). Poster apresentado no

XXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, **Anais...Goiânia**, GO, 25 a 31 Julho. Abstrato extendido No. 301, Resumos dos Trabalhos v. 2, p. 239-240, 1993.

STELLE, K. W.; BONISH, R. M.; DANIEL, R. M.; O'HARA, G. W. Effect of Rhizobial strains on host plant on nitrogen isotopic fractionation in legumes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, p. 1001-1004, 1983.

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3º ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, p. 719.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 888.

TATSUMI, J.; KONO, Y. Root Growth of Rice Plants in Relation to Nitrogen Supply from Shoot. **Japanese journal of crop science**, v. 49, n. 1, p. 112-119, 1980.

TECNOLOGIAS de produção de soja – Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. p. 265. (Embrapa Soja. Sistemas de Produção, 16).

TURNER, G. L.; BERGERSEN, F. J.; TANTALA, H. Natural enrichment of ^{15}N during decomposition of plant material in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 15, p. 495-497, 1983.

UNKOVICH, M. J.; PATE, J. S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N_2 fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 211-228, 2000. URQUIAGA, S.; SISTI, C. P. J.; SANTOS, H. P.; KOCHHANN, R.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. **Influence of crop rotation and soil tillage system in the organic C balance in na Oxisol (Typic Haplorthox)**. In: 17th WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 2002, Bangkok. Tailândia: 2002.

VALLIS, I. HAYDOCK, K. P., ROSS, P. J., HENZELL, E. F. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pastures. III. The uptake of small additions of ^{15}N -labelled fertilizer by *Rhodes grass* and *Townsville Lucerne*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 18, p. 865-877, 1967.

VITOUSEK, P. M. & FARRINGTON, H. Nutrient limitation and soil development: Experimental test of a biogeochemical theory. **Biogeochemistry**, v. 37, p. 63, 1997.

WACQUANT, J. P. OUKNIDER, M.; & JACQUARD, P. Evidence for a periodic excretion of nitrogen by roots of grass-legume associations. **Plant and soil**, v.116, p. 57-68, 1989.

WANG, M. Y.; GLASS, A. D. M.; SHAFF, J. E. & KOCHIAN, L. V. Ammonium uptake by rice roots. III. Electrophysiology. **Plant Physiology**, v. 104, p. 899-906, 1994.

WETSELAAR, R.; FARQUHAR, G. D. Nitrogen losses from tops of plants. **Advances in Agronomy**, v.33, p.263-302, 1980. WICHERN, F., MAYER, J., JOERGENSEN, R. G., MÜLLER, T. Rhizodeposition of C and N in peas and oats after ^{13}C - ^{15}N double labelling under field conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2527-2537, 2007a.

WICHERN, F., MAYER, J., JOERGENSEN, R. G., MÜLLER, T. Release of C and N from roots of peas and oats and their availability to soil microorganisms. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, p. 2829–2839, 2007b.

WICHERN, F.; EBERHARDT, E.; MAYER, J.; JOERGENSEN, R. G.; MÜLLER, T. Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: Methods, estimates and future prospects. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 30-48, 2008.

YONEYAMA, T.; FUJITA, K.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, T.; KAMBAYASHI, I.; YAZAKI, J. Variation in natural abundance of ¹⁵N among plant parts and in ¹⁵N/¹⁴N fractionation during N₂ fixation in the legume-rhizobia symbiotic system. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 27, p. 791-799, 1986.

YONEYAMA, T.; ITO, O.; ENGELAAR, W. M. H. G. Uptake, metabolism and distribution of nitrogen in crop plants traced by enriched and natural ¹⁵N: Progress over the last 30 years. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, n. 1, p. 121-132, 2003.

ZILLI, J. E.; MARSON, L. C.; CAMPO, R. J.; GIANLUPPI, V.; HUNGRIA, M.; SMIDERLE, O.J. **Avaliação da fixação biológica de nitrogênio na soja em áreas de primeiro cultivo no cerrado de Roraima**. Embrapa Roraima, 2006. p. 9, (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 20). ZOTARELLI, L. **Balço de Nitrogênio na rotação de culturas em sistemas de plantio direto e convencional na região de Londrina-PR**. 2000. 128 p. Tese (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ.

ZOTARELLI, L.; ZATORRE, N. P.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; JANTALIA, C. P.; FRANCHINI, J. C.; ALVES, B. J. R. Influence of no-tillage and frequency of a green manure legume in crop rotations for balancing N outputs and preserving soil organic C stocks. **Field Crops Research**, v. 132, p. 185-195, 2012.

7 APÊNDICE

Tabela AP 1. Enriquecimento com ^{15}N (%átomos ^{15}N excesso) e ^{15}N Planta ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta $^{-1}$) em diferentes partes da raiz de soja, marcadas com ^{15}N -Ureia e ^{15}N -Glutamina, em seis épocas de coleta.

Dias Após Marcação	Raiz principal		Raiz Secundária		Raiz Fina	
	Ureia	Gln	Ureia	Gln	Ureia	Gln
	átomos % ^{15}N excesso					
2	0,1562	c 0,1116	0,0933	cA 0,0494	b 0,0623	d 0,0472 ^{ns}
7	0,4253	ab 0,1359	0,3165	bA 0,0909	a 0,2569	c 0,0558
10	0,4596	a 0,0923	0,4454	aA 0,0827	a 0,3944	a 0,0731
14	0,4756	a 0,0894	0,4188	aA 0,0808	a 0,3877	a 0,0676
47	0,3596	b 0,0850	0,2891	bA 0,0875	a 0,3233	b 0,0934
70	0,2019	c 0,1102	0,2996	bA 0,0469	b 0,2885	bc 0,0448
Média	0,3463	0,1041	0,3105	0,0730	0,2855	0,0636
CV (%)	5,76		0,45		11,11	
	^{15}N Raiz ($\text{mg } ^{15}\text{N}$ excesso planta$^{-1}$)					
2	0,0068	d 0,0046	c 0,0053	c 0,0033	c 0,0083	d 0,0057
7	0,0260	c 0,0107	b 0,0191	b 0,0050	b 0,0415	c 0,0097
10	0,0517	b 0,0103	b 0,0299	a 0,0055	b 0,0906	b 0,0197
14	0,0993	a 0,0168	a 0,0445	a 0,0105	a 0,1194	ab 0,0191
45	0,0444	b 0,0116	ab 0,0308	a 0,0093	a 0,0703	a 0,0217
70	0,0198	c 0,0115	ab 0,0163	b 0,0029	c 0,0522	c 0,0072
Média	0,0413	0,0109	0,0243	0,0061	0,0637	0,0138
CV (%)	5,86		2,34		5,85	

Valores médios de 5 repetições, Letras minúsculas iguais na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de t (LSD) a 5% de probabilidade, ^{ns} não significativo.