

MAGDA ALINE DA SILVA

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO MOLÍBDICA NA  
CONTRIBUIÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N<sub>2</sub> EM CANA PLANTA**

RECIFE - PE

2016

MAGDA ALINE DA SILVA

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO MOLÍBDICA NA  
CONTRIBUIÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N<sub>2</sub> EM CANA PLANTA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciências do solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**Orientador**

Prof. Emídio Cantídio Almeida de Oliveira, Dr.

**Co-orientadores:**

Prof. Mario de Andrade Lira Junior, Dr.

Prof<sup>a</sup> Júlia Kuklinsky-Sobral, Dr<sup>a</sup>.

RECIFE - PE

2016

MAGDA ALINE DA SILVA

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO MOLÍBDICA NA  
CONTRIBUIÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N<sub>2</sub> EM CANA PLANTA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Agronomia-Ciências do solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora em 29 de fevereiro de 2016.**

**Orientador:**

Dr. Emídio Cantídio Almeida de Oliveira (DEPA/UFRPE)

---

**Examinadores:**

Dr. Renato Lemos dos Santos (IFPE/Campus Vitória)

---

Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin (CENA/USP)

---

RECIFE - PE  
2016

Ficha catalográfica

S586b Silva, Magda Aline da  
Bactérias diazotróficas e adubação molíbdica na contribuição da  
fixação biológica de N<sub>2</sub> em cana planta / Magda Aline da Silva.  
– Recife, 2016.  
107 f. : il.

Orientador: Emídio Cantídio Almeida de Oliveira.  
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo)  
– Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
de Agronomia, Recife, 2016.  
Referencias.

1. Cana-de-açúcar 2. Diluição isotópica 3. Molibdênio  
4. Micronutriente 5. Abundância natural 6. Bactérias diazotróficas  
I. Oliveira, Emídio Cantídio Almeida de, orientador II. Título

CDD 631.4

*“Que nada nos limite. Que nada nos defina. Que a liberdade seja a nossa própria substância.”*

Simone de Beauvoir

*“O vento é o mesmo, mas sua resposta é diferente em cada folha”.*

Cecília Meireles

*Às pessoas que, de alguma forma, contribuíram a elaboração deste precioso trabalho e às que estiveram próximos à mim, fazendo esta vida valer mais a pena.*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Como diria Anitelli: “Sonho parece verdade quando nós esquecemos de acordar”. Por isso, a partir de muita determinação, fé, perseverança, ousadia e maleabilidade pude arquitetar uma trajetória que culmina neste lindo trabalho. É difícil agradecer a todos que de algum modo, ajudaram na concretização deste sonho, mas minha gratidão deve ser apreciada pela grandeza de seus sentimentos.

A Deus, por me conceder a vida e dar forças para todas as coisas que vivi porque sei que o bem veio apenas dele. A maldade surgiu por ignorância e estupidez das pessoas aliada às minhas escolhas. Mas, a felicidade eu só devo ao pai.

A minha família, que a consanguinidade prevaleceu como mais importante e que independente de todos seus ideais, sempre acreditaram e apoiaram todas as minhas decisões.

A minha mãe, que apesar das dificuldades, nunca desistiu de enfrentar todos os impéccios da vida e fazer todos os sacrifícios para que suas filhas tivessem sempre o melhor. Nós três sabemos que não foram poucos. Infelizmente, não há espaço para escrever toda a gratidão que sinto por saber que graças a você, cheguei até aqui.

A minhas irmãs: Débora e Mayara, que tantos momentos ruins que passamos juntas não foram suficientes para impedir que os bons momentos fossem valorizados. Vocês não fazem ideia do quanto o apoio de vocês sempre foi importante para mim.

A meu sobrinho: Davi Miguel, que está a caminho.

A minha amiga Cíntia Teixeira, que de forma inexplicável e mágica construímos uma amizade verdadeira e concisa, motivo que tornou todos os problemas mais leves. Como já dizia Antoine de Saint- Exupéry: “Só se vê bem com o coração. O essencial é invisível aos olhos”. Por isso, me atrevo a dizer que a realização deste sonho, em parte, é responsabilidade sua.

A Robson Hortêncio, pela dedicação ao trabalho, pelas inúmeras risadas, e principalmente por sua verdadeira amizade. Amigo para todas as horas. Alegria de todo o tempo.

A meus amigos, por inúmeras vezes me ajudarem e me tranquilizarem, frente a todos os problemas encontrados na vida afora. Por firmarem um sentimento que com o tempo foi transformado em irmandade. Não vou me atrever a dizer que sou uma boa amiga, mas busquei sempre ser a melhor que joguei.

Ao meu orientador Emídio Cantídio Almeida de Oliveira, ao qual aprendi a admirar e respeitar. Como orientador, doou seus conhecimentos e guiou a presente pesquisa. Como amigo, dedicou paciência, incentivo e confiança nos momentos difíceis.

Aos professores Mario de Andrade Lira Junior e Júlia Kuklinsky-Sobral pela co-orientação, apoio, incentivo e atenção.

Aos professores Renato Lemos dos Santos e Paulo Cesar Ocheuze Trivelin pela compreensão, conselhos e ensinamentos ao qual foi fundamental ao desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, representados pelo professor Valdomiro Severino de Souza Júnior, pelo conhecimento transmitido e dedicação que fundamentaram a construção intelectual do trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Agronomia, Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade e formação profissional.

A toda equipe da UFRPE, em especial ao GEPAE que me auxiliaram na execução e conclusão das atividades deste trabalho: Os estagiários Raul, Bruno, Môema e Alysson, os alunos Augusto, Maércio, à PNPD Elane e a todos integrantes que tornaram este trabalho possível.

Aos colegas da Pós-Graduação, pelo convívio, alegrias, sorrisos que durante o curso, fizeram meus dias mais saborosos. Em especial a Hidelblandi Farias, Danilo Rodrigues,

Edivan Uchôa, Manuela Vieira, Martha Katharinne, Danúbia Lima, Patrícia Karla e Arianne Márcia.

Aos todos funcionários da UFRPE, em especial Maria do Socorro, por toda amizade, ajuda e carinho e a todos que dedicam seu trabalho ao programa e nos auxiliam sempre.

A usina Estreliana, pela parceria e disponibilidade dos vasos para realização do experimento.

A EECAC, representada por Djalma Simões Neto por ceder as mudas de cana-de-açúcar.

A UFRPE, pela oportunidade de ingressar na profissão de Engenheira Agrônoma.

Ao CNPq pela concessão da bolsa.

A FACEPE pelo custeio da pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação profissional e conclusão desta pesquisa.

Agradeço.

## **BIOGRAFIA**

MAGDA ALINE DA SILVA, filha de Marli da Silva Bezerra e Manoel Messias da Silva, nasceu em 12 de abril de 1991.

Em março de 2006 iniciou o curso técnico em Agroindústria, no Instituto Federal de Pernambuco (IFPE/Campus Vitória), no qual concluiu em dezembro de 2008.

Em Março de 2009 iniciou o curso de Agronomia, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, e que se graduou em março de 2014. Durante a graduação foi voluntária em pesquisas das áreas de Melhoramento Vegetal e Cultivo Protegido. Foi bolsista do Programa de Educação Tutorial (PET/MEC/SESu), atuando no PET Ecologia e Conservação da Natureza durante 2 anos e meio. Ainda enquanto bolsista PET atuou paralelamente em pesquisas nas áreas de Fruticultura, Fertilidade e Química Ambiental de Solos. Posteriormente foi bolsista de iniciação científica FACEPE, ainda na área de Fertilidade e Química Ambiental de Solos. Durante os referidos trabalhos na área de solos atuou em áreas de manejo de metais pesados em solo, estoque de carbono em solos e fertilidade do solo.

Em março de 2014 ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, na Universidade Federal Rural de Pernambuco, atuando na área de fertilidade do solo juntamente ao Grupo de Estudo de Extensão e Pesquisa em Agroenergia – GEPAE. Neste período, atuou em pesquisas relacionadas à adubação molíbdica, bactérias diazotróficas e fixação biológica de nitrogênio, submetendo sua defesa no dia 29 de fevereiro de 2016 para obter o título de “*Magister Scientiae*” em Ciência do solo.

## SUMÁRIO

<b>Lista de Figuras</b> .....	xii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xiii
<b>Abstract</b> .....	xv
<b>Introdução Geral</b> .....	16
<b>Fundamentação Teórica</b> .....	17
Referências Bibliográficas.....	27
<b>Capítulo I - Fixação biológica do N<sub>2</sub> atmosférico na cana-de-açúcar: estudo comparativo das espécies referência</b> .....	36
Resumo .....	37
Abstract.....	38
Introdução.....	39
Material e Métodos.....	41
Resultados e Discussões .....	51
Conclusões.....	56
Referências bibliográficas .....	57
<b>Capítulo II - Adubação molíbdica na fixação biológica de nitrogênio em cana planta</b> .....	62
Resumo .....	63
Abstract.....	64
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	67
Resultados e Discussões .....	79
Conclusões.....	97
<b>Considerações Finais</b> .....	98
Referências Bibliográficas.....	99

## LISTA DE FIGURAS

---

### Capítulo I

---

Figura 1 - Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ).  
Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten. ... 46

---

### Capítulo II

---

Figura 1 - Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ).  
Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten. ... 73

---

## LISTA DE TABELAS

---

### Capítulo I

---

Tabela 1 - Caracterização química e física do solo e do extrato da pasta saturada	42
Tabela 2 - Abundância de átomos de <sup>15</sup> N, acúmulo do N total na parte aérea (QNT) e atividade da enzima nitrogenase (AN) para os espécimes utilizados como referência e para cana-de-açúcar adubada e não adubada com N, em diferentes fases de crescimento. .....	52
Tabela 3 - Contribuição do N derivado do solo e da FBN nas plantas de capim colônia, tiririca e sorgo e para cana-de-açúcar sem N em diferentes fases de crescimento, quando utilizada a cana-de-açúcar adubada com N como referência.....	55

---

### Capítulo II

---

Tabela 1 - Caracterização química e física do solo e do extrato da pasta saturada	69
Tabela 2 - Avaliação biométrica na a variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 50 DAG sem e com o Mo e N e inoculação com bactérias diazotróficas .....	83
Tabela 3 - Avaliação biométrica na a variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 100 DAG sem e com o Mo e N e inoculação com bactérias diazotróficas .....	84
Tabela 4 - Biomassa seca da parte aérea (BSPA) para cana-de-açúcar com 100 DAG na sem e com Mo, sem e com N e inoculação com bactérias diazotróficas .....	85
Tabela 5 - Clorofila total, atividade da redutase do nitrato e atividade da nitrogenase na variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 50 DAG na sem e com de Mo e N, e inoculação com bactérias diazotróficas .....	87
Tabela 6 - Médias da avaliação da Clorofila total e das enzimas Redutase do Nitrato e Nitrogenase da variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 100 DAG na sem e com de Mo e N e inoculação com bactérias diazotróficas .....	88
Tabela 7 - Abundância de átomos de <sup>15</sup> N, acúmulo de N na parte aérea (QNT), contribuição do nitrogênio derivado da fixação (%Ndffix), quantidade de N derivado da fixação (QNdffix), contribuição do nitrogênio derivado do solo (%Ndfsolo), quantidade de N derivado do solo (QNdfsolo) na variedade RB867515 com e sem aplicação de adubo nitrogenado (2,90 g vaso <sup>-1</sup> de ureia). .....	90
Tabela 8 - Contribuição do nitrogênio derivado do solo e da FBN em % e teor de nitrogênio total (QNT) em g planta <sup>-1</sup> da variedade RB867515 aos 50 DAG com e sem aplicação de adubo nitrogenado (2,90 g vaso <sup>-1</sup> de ureia).....	94
Tabela 9 - Contribuição do nitrogênio derivado do solo e da FBN em % e teor de nitrogênio total (QNT) em g planta <sup>-1</sup> da variedade RB867515 aos 100 DAG com e sem aplicação de adubo nitrogenado (2,90 g vaso <sup>-1</sup> de ureia).....	95

## RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas na cana-de-açúcar apresenta resultados variáveis e pouco consistentes, o que tem limitado o uso dos inoculantes. A FBN é catalisada pela enzima nitrogenase, que possui na sua constituição o componente MoFe-proteína. Assim, a utilização do molibdênio (Mo) em plantas inoculadas com bactérias diazotróficas fixadoras do N<sub>2</sub> atmosférico pode ser utilizado como alternativa para elevar os incrementos da FBN nas culturas não leguminosas como a cana-de-açúcar. O método da diluição isotópica do <sup>15</sup>N atualmente empregado para quantificar a FBN na cana-de-açúcar, utiliza como planta referência espécies com fisiologia de crescimento e marcha de absorção do N distintas, o que aumenta a variação e reduz a confiabilidade dos resultados. Diante do contexto, realizaram-se dois estudos, o primeiro para avaliar os principais espécimes de plantas referência na quantificação da FBN para a cana-de-açúcar e o segundo estudo teve como objetivo avaliar a contribuição da adubação molíbdica no incremento da FBN por bactérias diazotróficas inoculadas na cana planta. A interação do Mo na FBN foi avaliada pela atividade da enzima nitrogenase e pelo método da diluição isotópica a partir do enriquecimento do solo com 2% de átomos de <sup>15</sup>N, utilizando a cana-de-açúcar adubada com nitrogênio como planta referência. O experimento foi conduzido em vasos, com solo de textura arenosa. No primeiro experimento, as espécies mais utilizadas como planta referência foi comparada com a cana-de-açúcar adubada e não adubada com N, utilizando o delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições. No segundo experimento, avaliou-se a interação entre adubação nitrogenada, Mo e inoculantes contendo bactérias diazotróficas utilizando o arranjo fatorial de 2 x 2 x 3, em delineamento estatístico de blocos casualizados, com 4 repetições. A cana-de-açúcar adubada com N apresentou a menor diluição do <sup>15</sup>N, indicando restrição da FBN e sua recomendação como planta controle. O capim colônia (*Panicum maximum* L.) e a tiririca (*Cyperus rotundus* L.) apresentaram elevada FBN, o que as torna não recomendáveis como espécies controle para quantificar o N<sub>2</sub> fixado pelo método da diluição isotópica do <sup>15</sup>N. O uso do micronutriente Mo interagiu positivamente com as bactérias diazotróficas inoculadas no crescimento e desenvolvimento da cana planta, bem como na FBN. Entretanto, os incrementos encontrados não foram suficientes para suprir a necessidade total do N, mostrando a importância da adubação nitrogenada para cana planta.

**Palavras Chave:** Cana-de-açúcar, Diluição isotópica, Molibdênio, Micronutriente.

## ABSTRACT

The Biological Nitrogen Fixation (BNF) realized by diazotrophs bacteria in sugarcane has variable and somewhat inconsistent results, which has limited the use of inoculants. The BNF is catalyzed by the enzyme nitrogenase, which has in its constitution the MoFe-protein component. Thus, the use of molybdenum (Mo) in plants inoculated with atmospheric nitrogen N<sub>2</sub> fixing bacteria can be used as an alternative to elevate the increments of BNF in non-leguminous crops such as sugarcane. The method of the <sup>15</sup>N isotope dilution currently employed to quantify the BNF sugarcane, used as reference plant species with growth physiology and running N distinct absorption, which increases the variation and reduces the reliability of the results. In the context, two studies were carried out, the first one was to evaluate the main specimens of reference plants in the quantification of FBN for sugarcane and the second study was to evaluate the contribution of molybdenum fertilizer in increasing BNF by bacteria diazotrophic inoculated in the plant cane. The interaction of Mo in FBN was evaluated by the nitrogenase enzyme activity and the method of isotopic dilution from soil enrichment with 2% of <sup>15</sup>N atoms, using sugarcane fertilized with nitrogen as the reference plant. The experiment was conducted in pots with a sandy soil. In the first experiment, the species most commonly used as a reference plant was compared to sugarcane fertilized and non-fertilized with N, using a completely randomized design, with four repetitions. The second experiment evaluated the interaction between nitrogen fertilization, Mo and inoculants containing diazotrophs using factorial arrangement of 2 x 2 x 3, statistical design of randomized blocks with four repetitions. The sugarcane fertilized with N had the lowest dilution of <sup>15</sup>N, indicating restriction of FBN and its recommendation as plant control. The guinea grass (*Panicum maximum* L.) and purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) showed high FBN, which makes them not recommended as species control to quantify the N<sub>2</sub> fixed by the method of isotopic dilution of <sup>15</sup>N. The use of micronutrient Mo interacted positively with the diazotrophs inoculated in the growth and development of plant cane, as well as in the BNF. However, the increases were not found sufficient to meet the total requirement of N, showing the importance of nitrogen fertilizer to plant sugarcane.

**Key words:** Sugarcane, isotopic dilution, Molybdenum, Micronutrient.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é atualmente o maior produtor de açúcar e etanol do mundo, no qual é considerado um país de referência internacional em tecnologia desses subprodutos. Além disso, também é considerado o maior exportador de açúcar e o segundo maior exportador de etanol. Dessa forma, a cana-de-açúcar é uma cultura agrícola que se destaca no mercado internacional e apresenta importância social, econômica e política para o país.

Por outro lado, o cultivo da cana-de-açúcar é responsável pelo consumo de parte significativa dos insumos agrícolas utilizados no país, principalmente no que diz respeito aos fertilizantes nitrogenados. Por isso, técnicas que visem elevar o aproveitamento do fertilizante nitrogenado de forma mais sustentável tornam-se importantes, visto que o nitrogênio é nutriente mais limitante ao crescimento e produtividade dos canaviais.

Neste sentido, o micronutriente molibdênio é indicado como um potencializador da utilização do nitrogênio atmosférico, bem como intensificador de maior absorção do nitrogênio na forma de nitrato, em razão da sua participação no transporte de elétrons durante as reações bioquímicas nos complexos enzimáticos nitrogenase e redutase do nitrato, ambos catalizadores da assimilação metabólica do azoto. Por isso, torna-se importante a avaliação da contribuição do Mo nessas duas enzimas para a cultura da cana-de-açúcar, visto que o micronutriente pode ajudar a elevar os teores de N na planta oriundo da atmosfera e aumentar a produtividade dos canaviais.

A enzima nitrogenase está diretamente relacionada à Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), em que na cana-de-açúcar é realizada por microrganismos diazotróficos. Esses organismos podem ser de vida livre ou se associar às raízes da planta de forma rizosférica, epifítica ou endofítica.

A avaliação da contribuição de N na planta pelos microrganismos diazotróficos e da atividade da enzima nitrogenase é feita por meio do método de redução do acetileno e pelas técnicas baseadas na diluição do isótopo  $^{15}\text{N}$ , podendo ser classificadas como abundância natural. O método da redução do acetileno é considerado uma técnica sensível à atividade da enzima, barato, e de boa reprodutibilidade. Contudo, apresenta algumas problemáticas no método discutidas na literatura. A técnica da abundância natural utiliza como princípio a constituição de 0,366% de átomos de  $^{15}\text{N}$  dos materiais e têm como base a diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  naturalmente existente entre a atmosfera e o solo. Por outro lado, as dificuldades e incertezas em se utilizar o método de abundância natural provêm da utilização de espécies controle com marchas de absorção de N distintas, bem como

diferente volume de solo explorado, crescimento radicular diferenciado, fases de crescimento desigual e possível contribuição da FBN nessas espécies, tornando-as inaptas para realização da técnica. Dessa forma, se faz necessário estudos que adotem técnicas mais confiáveis para a quantificação da FBN utilizando o marcador  $^{15}\text{N}$ , assim como a avaliação da utilização dessas espécies e da própria cana-de-açúcar como controle.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. A cultura da cana de açúcar

A cana-de-açúcar é uma angiosperma, monocotiledônea, pertencente à família Poaceae e ao gênero *Saccharum* spp. Este gênero possui seis espécies distintas, dos quais, a cana-de-açúcar mais comumente difundida é classificada como *Saccharum officinarum* e apresenta diversas variedades cultivadas (DANIELS e ROACH, 1987). A cultura é originária da região da Melanésia, Sudeste Asiático, no qual foi domesticada e disseminada por toda a região. Acredita-se que a cana-de-açúcar é cultivada desde a antiguidade e que tenha se estabelecido como cultura de importância agrônoma possivelmente em 2500 a.C. (DANIELS & ROACH 1987; RIDESA, 2010).

A cultura foi introduzida no Brasil no início do século XVI, com a chegada do militar Martim Afonso de Souza a capitania São Vicente, e no século XVII, o país já era considerado o maior produtor mundial de açúcar (DIAS, et al., 2015). Por isso, a cultura apresenta importante papel na formação econômica, política e social do país.

A cultura da cana-de-açúcar é uma planta de metabolismo C4 com ciclo de vida longo e perene (GÓMEZ-MERINO et al., 2014). Se destaca em países de clima tropical por apresentar alta produtividade e vigoroso crescimento, e por isso, se adaptou bem as regiões do Brasil (LE COUTEUR e BURRESON, 2006; MARIN e NASSIF, 2012). Quando comparado a outras culturas energéticas, a cana-de-açúcar no Brasil tem um balanço de emissões de gases de efeito estufa favorável, emitindo apenas de 389 kg m<sup>3</sup> de GEE (FAO, 2012; GOLDEMBERG et al., 2008). Além disso, possui balanço de carbono neutro, emitindo fluxo de CO<sub>2</sub> de 1054 μmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, mas consumindo esse total nos três primeiros ciclos da cultura (CABRAL, et al., 2013).

Atualmente, 63% dos canaviais brasileiros são cultivados com variedades da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA, no qual a variedade RB867515 é a mais cultivada do país, representando cerca de 27,3%

(RIDESA, 2010; CONAB, 2014). Esta variedade, foi lançada pela Universidade Federal de Viçosa e possui alta performance produtiva e alto teor de sacarose, além de ter excelente desenvolvimento e desempenho em solos de textura arenosa (RIDESA, 2010).

Dessa forma, a cultura da cana-de-açúcar apresenta papel ambiental fundamental na sustentabilidade, o que gera impactos socioeconômicos favoráveis ao cultivo da cultura no país visto que as atenções atuais são voltadas ao modelo brasileiro de biocombustíveis e o desenvolvimento de fontes renováveis e limpa.

## **2.2. Avaliação econômica da cultura da cana-de-açúcar**

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e apresenta uma indústria sucroenergética moderna e competitiva, destacando-se como referência internacional em tecnologia de produção de açúcar, etanol e energia elétrica de biomassa, bem como do aproveitamento sustentável de seus subprodutos. O país é responsável por 20,6% de toda a produção mundial de cana-de-açúcar, sendo colhidas 659,10 milhões de toneladas de colmos, em uma área de 9.070,4 milhões de hectares, distribuídos em todos os estados brasileiros, que totaliza produtividade média de 72,17 Mg ha<sup>-1</sup>e representa 13,35% da área agrícola do País (CONAB, 2015; MAPA, IBGE, CEPAGRO, 2015).

As perspectivas mostram que na safra 2015/2016 haverá incremento de 1,9% na produção de etanol (CONAB, 2015) o que é importante devido ao papel ambiental que o etanol representa frente aos derivados do petróleo, uma vez que esse produto da cana-de-açúcar, é considerado como alternativa para reduzir em 80% a emissão de gases de efeito estufa (WANG, et al., 2014).

Os produtos da cana-de-açúcar possuem destaque privilegiado com participação de 5,7% das exportações brasileiras (SECEX, 2013). Os bons números apresentados e o aprimoramento tecnológico permitem que o País seja também o maior exportador mundial de açúcar, respondendo sozinho por 45,3% de todo o produto comercializado no mundo (RFA, 2014; USDA, 2014). Na fabricação de etanol, o Brasil é autossuficiente no consumo do produto e compartilha com os EUA, a posição de maior produtor mundial (26,6% da produção mundial). Na prática, os dois países são responsáveis por 83,4% de toda a fabricação desse combustível no mundo, todavia, os EUA consomem em torno de 58,5% da produção brasileira de etanol (RFA, 2014; USDA, 2014).

### **2.3. Utilização de fertilizantes nitrogenados pela cultura da cana-de-açúcar**

Apesar das vantagens competitivas de mercado que a cultura da cana-de-açúcar representa, tanto no cenário nacional quanto internacional, o Brasil é dependente da matéria-prima fertilizante para o cultivo. O país considerado o quarto em consumo de fertilizantes com cerca de 33 milhões de toneladas, o que corresponde a 7% do consumo global e 75% de todo produto utilizado no país (SECEX; 2013; ANDA, 2015). Em adição, é considerado o terceiro maior importador de fertilizantes nitrogenados e potássicos e o segundo maior importador de fertilizantes fosfatados (75%, 90% e 45% respectivamente) o que, em relação à safra anterior, representa um aumento de 5% (ANDA, 2014).

Embora a demanda por fertilizantes seja crescente pela cultura da cana-de-açúcar, o baixo aproveitamento dos nutrientes aplicados via adubação é considerado o fator mais limitante à produtividade dos canaviais Brasileiros. FRANCO et al. (2011) verificou que a contribuição do N proveniente do fertilizante na cana-de-açúcar variou entre 40 a 10% na cana planta e de 70 a 30% na soca, respectivamente, entre o início e o final do ciclo de crescimento. Este resultado não levanta apenas questões relacionadas à eficiência da adubação nitrogenada, mas também tornam interessantes novas técnicas que consigam reduzir o custo dos fertilizantes nitrogenados e aumentar a produtividade das culturas.

Na cultura da cana-de-açúcar o nitrogênio é responsável pela brotação e perfilhamento. Ainda possui papel essencial no desenvolvimento e produtividade da cultura (MARTINS, 1992). Segundo Vale et al. (2011), o N é considerado o nutriente mais limitante ao crescimento da planta, restringindo o acúmulo de matéria seca, o crescimento das plantas e de raízes em 92%, 91% e 83% respectivamente. Deste modo, este resultado abre possibilidades a estudos que almejem elevar a produtividade dos canaviais e longevidade das soqueiras de cana-de-açúcar.

O baixo aproveitamento do N-fertilizante pela cultura da cana-de-açúcar, principalmente na cana planta, evidencia a contribuição de outras fontes de N para suprir a exigência da planta, estimadas em 160 kg ha<sup>-1</sup> para a cana planta e 182 kg ha<sup>-1</sup> para a cana soca (TRIVELIN et al., 2013; OLIVEIRA, et al., 2016). Entre as possíveis fontes, se destacam a mineralização do N da matéria orgânica do solo e dos restos culturais favorecida pelo revolvimento do solo durante a reforma do canavial (CANTARELA, 2007), bem como, a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) atmosférico por organismos diazotróficos capazes de formar associações por meio de colonização radicular e dos

tecidos internos da planta, estabelecendo associações endofíticas (CANTARELLA, 2007).

#### 2.4. Bactérias diazotróficas

As bactérias diazotróficas são organismos procariotos que têm a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico tornando-o disponível à planta na forma de amônio (MOREIRA et al., 2010). Dessa forma, essas bactérias são capazes de reduzir o nitrogênio molecular ( $N\equiv N$ ), em condições normais de temperatura e pressão e disponibilizar às plantas de uma forma assimilável. Conforme Videira (2012) apesar de uma reação termodinamicamente favorável, esta não ocorre espontaneamente, visto que a ligação tripla que envolve dois átomos de nitrogênios é muito estável e de difícil quebra.

Estes organismos podem ser de vida livre no solo ou se associar as raízes de espécies vegetais na rizosfera. Quando associados, podem estabelecer simbioses ou colonizar endofiticamente os tecidos (BHATTACHARJEE et al., 2008; JOHNSTON-MONJE & RAIZADA, 2011). As bactérias diazotróficas rizosféricas são aquelas que colonizam o solo próximo às raízes; as bactérias diazotróficas epifíticas colonizam a superfície dos tecidos vegetais; enquanto que as endofíticas são aquelas capazes de colonizar internamente os tecidos vegetais sem causar sintomas de doenças (DÖBEREINER, 1992; BALDANI et al., 1997; MONJE & RAIZADA, 2011). Dessas bactérias, as mais abundantes nas raízes das plantas são as endofíticas, em que a densidade populacional é reduzida em direção ao caule e folhas (LAMB et al., 1996; GOMES et al., 2005).

A primeira bactéria diazotrófica foi descrita no ano de 1893 o que gerou grande impacto na literatura (FERNANDES, 2006). A identificação dessas bactérias teve início com o gênero *Beijerinckia* sp. e *Azotobacter* sp. nos quais foram percussores em estudos de bactérias associativas (BEIJERINCK, 1901; DOBEREINER, 1961). Ao mesmo tempo, foi identificado o gênero *Derxia* sp. (JENSEN, et al., 1960), que por falta de métodos adequados de isolamento e ser um gênero muito restrito à região amazônica, seus conhecimentos são escassos (MOREIRA, 2010). Posteriormente, foram identificados os gêneros *Azospirillum* sp. (TARRAND et al., 1978), *Herbaspirillum* sp. (BALDANI et al. 1986), *Gluconacetobacter* sp. (GILLIS et al., 1989), e *Burkholderia* sp. (YABUUCHI et al., 1992) no interior das raízes, colmos e folhas o que incentivou os estudos de associação em culturas não leguminosas (JAMES, 2000; BODDEY et al.,

2003; CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Além desses gêneros, mais recentemente identificados são conhecidos os *Azoarcus* sp. (REINHOLD-HUREK et al., 1993), *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp. (SELDIN et al., 1998) dentre outras espécies de bactérias distintas podem ser consideradas associativas a partir de suas características fenotípicas, composição dos ácidos graxos e sequenciamento de gene.

Nas condições de cultivo do Nordeste brasileiro, o grupo de pesquisa em microbiologia e fertilidade do solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco identificou nas raízes e no solo rizosférico das variedades de cana-de-açúcar RB92579 e RB867515 o gênero *Burkholderia* sp., bem como outros gêneros de bactérias diazotróficas como: *Pantoea* sp., *Bacillus* sp., *Erwinias* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. e *Dyeila* sp. (LIMA, 2012). Desses gêneros, foram selecionadas 10 linhagens identificadas como fixadoras de N atmosférico, solubilizadoras de fosfato de cálcio, produtoras de ácido indol acético (AIA) e de quorum sensing.

As mesmas foram reinoculadas nos colmos sementes das mesmas variedades com finalidade de avaliar o potencial de crescimento da associação em duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515). Os tratamentos apresentaram diferentes respostas, em que na variedade RB92579 as linhagens dos gêneros *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* e *Pantoea* promoveram maior produção de biomassa seca da parte aérea, enquanto que na variedade RB867515 apenas as linhagens dos gêneros *Erwinia* e *Burkholderia* se mostraram mais promissoras (LIMA, 2012).

Trabalhos como Lima et al. (1987), Boddey et al. (1991) e Urquiaga et al. (1992) estimaram que a contribuição das bactérias diazotróficas na FBN de cultivares de cana-de-açúcar podiam suprir até 60% do N total requerido pela cultura. Entretanto, trabalhos mais recentes mostram que a contribuição das bactérias diazotróficas em cultivares brasileiras é de aproximadamente de 40 kg ha<sup>-1</sup> de N, o que representa 20% do N total assimilado pela planta (URQUIAGA et al., 2012). Mesmo assim, as bactérias diazotróficas são importantes devido desempenho benéfico que estas exercem sobre as plantas tais como maior produção de AIA, solubilização de fosfato inorgânico e resistência à salinidade (SANTOS et al., 2012).

Alguns autores como Boddey et al., (2003) também sugeriram que a FBN pode ser aperfeiçoada com a aplicação de alguns conhecimentos específicos da simbiose como a utilização de bactérias mais específicas e eficientes, o uso de variedades mais favoráveis à inoculação ou métodos que proporcionem a maximização da FBN em cana-de-açúcar. Assim, faz-se necessário o estudo mais detalhado da relação planta-hospedeiro por meio

de técnicas confiáveis, que sejam de fácil quantificação e que proporcionem um melhor entendimento do sistema solo-planta-atmosfera.

## 2.5. Técnicas de avaliação da FBN em cana-de-açúcar

Para avaliar a contribuição da FBN em cana-de-açúcar realizada por organismos diazotróficos são comumente utilizadas a técnica baseada na redução de acetileno (HARDY et al., 1968) e a técnicas baseadas na diluição do isótopo  $^{15}\text{N}$ , podendo ser classificadas como abundância natural (SHEARER E KOHL, 1986).

A aplicabilidade da utilização de  $^{15}\text{N}$  nos estudos de FBN foi indicada por Burris e Miller (1941) utilizando a espécie *Azotobacter vinelandii* em atmosfera marcada a 35% de  $^{15}\text{N}$ . Esta técnica é utilizada como método referência para os demais métodos, todavia apresenta algumas dificuldades em sua aplicação, como enriquecimento constante da atmosfera com  $^{15}\text{N}$ , controle diário do  $\text{CO}_2$  e reposição do  $\text{O}_2$  (TRIVELIN et al. 1984).

A técnica de abundância natural utiliza como base, a pequena diferença significativa da abundância de  $^{15}\text{N}$  que ocorre naturalmente entre a atmosfera e o solo (SHEARER E KOHL, 1986). Esta técnica permite uma melhor compreensão do nutriente no sistema solo-planta-atmosfera, e parte do princípio que todos e qualquer material existente na natureza possui em sua constituição uma proporção de 0,366% de átomos de  $^{15}\text{N}$  em relação a quantidade de N total do material.

As dificuldades e incertezas em quantificar a FBN em cana-de-açúcar quando se utiliza o método da abundância natural de  $^{15}\text{N}$  provém da dificuldade de obter uma espécie controle não fixadora para quantificar a contribuição do  $\text{N}_2$  atmosférico. Atualmente, várias espécies de ervas daninhas são utilizadas como espécies referências, principalmente a tiririca (*Cyperus rotundus* L.), por sua maior distribuição em solos cultivados da região tropical e adaptação aos diversos tipos de ambientes (DURIGAN et al., 2005).

Além da tiririca, outras plantas como o sorgo (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench), o painço (*Panicum miliaceum* L.), milheto (*Pennisetum glaucum*(L.) R. Brow), o milho (*Zea mays* L.), o capim colonião (*Panicum maximum* L.), o repolho (*Brassica oleracea capitata* L.) e o azevém (*Lolium perene* L.) também são utilizadas como referência para o método (BAPTISTA et al., 2014; OLIVEIRA, 2012; SCHULTZ et al., 2012; TAULÉ et al., 2012).

A utilização dessas plantas como espécie referência representa limitações que podem levar os pesquisadores às conclusões equivocadas sobre a FBN. Segundo Oliveira (2012) quando se utiliza as plantas invasoras coletadas no próprio local de cultivo ou culturas como o sorgo, azevém e repolho como planta referência, a contribuição da FBN na cana-de-açúcar apresenta variações entre 23 a 68%. Essas espécies possuem mecanismos de absorção de N distintos, fases de crescimento desigual, crescimento radicular diferenciado e volume de solo explorado pelas raízes diferente da cultura da cana-de-açúcar, sendo consideradas inaptas para estudos comparativos de FBN.

Dessa forma, a incerteza da real contribuição da fixação do N<sub>2</sub> com uso dessas plantas como referência na cana-de-açúcar demonstra a necessidade de adotar novos métodos empregando o traçador <sup>15</sup>N que utilizem a própria cultura da cana-de-açúcar como planta referência. Assim, se a cana-de-açúcar utiliza como fonte de N o solo e a atmosfera, e o solo for artificialmente enriquecido com o isótopo <sup>15</sup>N é possível determinar a contribuição de cada fonte a partir da avaliação de abundância desse isótopo nos tecidos da planta. Em hipótese, a cana-de-açúcar adubada com <sup>15</sup>N apresentará abundância do átomo muito semelhante a marcação disponível no solo enriquecido, enquanto que uma cana-de-açúcar sem inoculação ou inoculada com bactérias fixadora de N<sub>2</sub> apresentará valores de diluição superior ao solo. À medida em que a FBN aumentar, o valor de diluição isotópica na planta inoculada tende a zero e a contribuição pode ser quantificada (BALDANI et al., 2009).

Em adição ao método da diluição isotópica do <sup>15</sup>N, é difundido o método da redução do acetileno que também deve ser utilizado para identificar a ocorrência da FBN, principalmente nas plantas referências. A enzima nitrogenase é muito versátil e além de conseguir catalisar a reação do N<sub>2</sub>, consegue reduzir outros compostos, incluso o acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>). O uso do acetileno como reagente para avaliação da atividade da enzima AN e da FBN foi descrito por Hardy et al. (1968). Para a assimilação do N<sub>2</sub> em 2NH<sub>3</sub> são necessários seis elétrons e para a redução do acetileno são necessários dois elétrons. Assim, para cada mol de N<sub>2</sub> reduzido, são convertidos três moles de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> o que gera um fator de equivalência de 3:1 para a reação (HARDY et al., 1972).

Entretanto, o método da redução do acetileno é considerado semiquantitativo em medidas da fixação do N<sub>2</sub> atmosférico em virtude da necessidade de usar esse fator de equivalência para expressar os resultados de redução de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> em N<sub>2</sub>. Além disso, outros pontos ainda são discutidos na literatura que podem alterar essa relação como outros compostos que podem reduzir o acetileno, a variação da enzima conforme as diferentes

espécies, as variações em função dos horários de avaliação, fase de desenvolvimento da cultura e condições de desenvolvimento do vegetal (DOMMERGUES et al., 1973; HARDY et al., 1973; SILVESTER & BENNETT, 1973; Add referência).

Esta técnica é bastante utilizada e difundida por ser barata, apresentar boa reprodutibilidade e ser sensível à reação da enzima nitrogenase em estudos qualitativos de um organismo diazotrófico (HARDY et al., 1968). Deste modo, a ocorrência da FBN avaliada por ambos os métodos, promoverá maior refinamento na confirmação da presença o N<sub>2</sub> fixado na cana-de-açúcar.

## **2.6. O molibdênio e sua importância na cultura da cana-de-açúcar**

O molibdênio (Mo) é um micronutriente aniônico, absorvido pelas plantas através de proteínas de alta afinidade e requerido em quantidades inferiores a 1 mg kg<sup>-1</sup> (FERNANDES, 2006). Mesmo assim, sua deficiência é tão limitante quanto a dos macronutrientes, visto que este nutriente possui importante papel no metabolismo do N para as plantas (TAIZ E ZEIGER, 2013).

O Mo participa como co-fator no complexo enzimático da nitrogenase, enzima responsável pela quebra da ligação tríplice do N<sub>2</sub> e conversão a NH<sub>3</sub>, processo realizado por bactérias associativas utilizando energia celular na forma de ATP (REIS E TEIXEIRA, 2005; SCHWARZ et al., 2009). Ele também participa do complexo enzimático redutase do nitrato, responsável pela redução de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no processo assimilativo do N do solo (TAIZ E ZEIGER, 2013). Em ambos processos, a função do nutriente está ligada ao transporte de elétrons durante as reações bioquímicas e a deficiência do Mo implicará em menor atividade das enzimas com consequente redução do processo simbiótico e da assimilação de N (FERREIRA et al., 2003; MENGEL; KIRKBY, 2001).

A atividade da nitrogenase (AN) é composta por duas subunidades: A azotoferrodoxina (Componente II ou Fe-proteína) e a molibdoferrodoxina (Componente I ou MoFe-proteína), na qual ambas encontram-se em permanente cooperação associativa durante o processo da FBN (TAIZ e ZEIGER, 2013). As propriedades intrínsecas dessa enzima podem modificar a fisiologia e atividade dos organismos diazotróficos. Dentre estas propriedades, podemos citar a sensibilidade ao oxigênio atmosférico, a necessidade dos metais Fe, Mo ou V, o suprimento adequado de NADPH (poder redutor), MgATP

para a sua atividade e ambiente em que haja disponibilidade de N (REIS E TEIXEIRA, 2005).

Em virtude da necessidade do molibdênio (Mo) na AN, acredita-se que o incremento da sua maior disponibilidade elevará os incrementos da FBN nas culturas que realizam associações com bactérias fixadoras. Em leguminosas, como no feijoeiro, Almeida (2010) observou efeitos positivos da aplicação do Mo aplicado via semente na contribuição da FBN. Segundo os mesmos autores, plantas originadas de sementes com alto teor de Mo tiveram maior contribuição da FBN em relação plantas originadas com baixos teores do nutriente, sendo verificado incrementos na contribuição da FBN de 12,7 % para 49,8 % com a adição do micronutriente.

Ao avaliar o efeito da adubação molíbdica na AN e na FBN de diferentes variedades de cana-de-açúcar, Santos (2014) observou incremento de 32 % na atividade da AN proporcionado pela presença de Mo nas plantas que não receberam N. Com a aplicação de N, o Mo só foi responsável por um incremento de 24%. Esse resultado sugere um incremento na FBN com a aplicação do adubo molíbdico e a sua interação com a FBN torna-se necessário como estratégia de redução da adubação nitrogenada em cana-de-açúcar.

Além desse aspecto, o Mo pode atuar na enzima redutase do nitrato (ARN) de forma a auxiliar na assimilação e utilização de N absorvido do solo. Santos (2014) observou na variedade de cana-de-açúcar RB867515 que a aplicação de 200 g ha<sup>-1</sup> de molibdato de sódio aumentou a atividade da ARN na folha +1 e nas raízes de cana-de-açúcar. Toledo et al. (2010) verificaram que com a aplicação de 60 g de molibdato de amônio via foliar na cultura da soja, a atividade da enzima ARN foi duplicada.

A eficiência na utilização do N pela planta considera os aspectos de absorção e metabolização deste elemento. Quando o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é absorvido, pode seguir diferentes rotas na planta. Inicialmente, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pode ser acumulado no vacúolo, tanto na raiz como na parte aérea. Assim, a ARN converte o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorvido em nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) via atividade a enzima que utiliza o NADH como fonte de elétrons para a reação. O local dessa reação varia conforme as espécies e dessa forma, o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pode ser reduzido nas raízes ou ser transportado para a parte aérea via xilema e ser reduzido nas folhas (TAIZ E ZEIGER, 2013).

Após essa etapa, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> resultante da reação é considerado tóxico às plantas e por isso, é reduzido e metabolizado. Essa reação é realizada via enzima redutase do nitrito e requer seis elétrons para transformar o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Esse amônio gerado é rapidamente

incorporado em compostos orgânicos em razão de sua toxicidade pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintetase, formando aminoácidos. Estes aminoácidos formados são armazenados no vacúolo para posterior utilização pela planta (TAIZ E ZEIGER, 2013).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. Anuário Estatístico 2014 [da] ANDA. São Paulo, 2014, Anual.

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

BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOGUEIRA, E.M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E. B.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G.; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S.; BODDEY, R.M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família da Poaceae (antiga Gramineae). In: RIBEIRO, M.R.; NASCIMENTO, C.W.; RIBEIRO FILHO, M.R. & CANTALICE, J.R.B., (Ed.) **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2009, v.6, p.203-271.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. *Burkholderia brasiliensis* sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. Rio de Janeiro, v.69, n. 1, 1997. 116 p.

BAPTISTA, R. B.; DE MORAIS, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Variations in the <sup>15</sup>N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N<sub>2</sub> fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 124–129, 2014.

BEIJERINCK, M.V. Über oligotrophile Mikroben. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, **Infektionskrankheiten und Hygiene**. v. 7, p. 561-582, 1901.

BHATTACHARJEE, R.B; SINGH, A.; MUKHOPADHYAY, S.N. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertilizer for non-legumes: prospects and challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New Delhi, v. 80, n. 2, p.199-209, 2008.

BODDEY, R.; URQUIAGA, S.; REIS, V.; DÖBEREINER, J. Biological Nitrogen Fixation Associated with sugar cane. **Plant and Soil**, v. 137, n. 1, p. 111–117, 1991.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugar cane: present knowledge and future applications. **Plant Soil**, v. 252, p. 139–149, 2003.

BURRIS R.H.; MILLER C.E. Application of <sup>15</sup>N to the study of Biological Nitrogen Fixation. **Science**, v. 93, p. 114–115, 1941.

CABRAL, O. M. R.; ROCHA, H. R.; GASH, J. H.; LIGO, M. A. V.; RAMOS, N. P.; PACKER, A. P.; BATISTA, E. R. Fluxes of CO<sub>2</sub> above a sugarcane plantation in Brazil. **Agricultural and Forest Meteorology**, São Paulo, v. 182, n. SI, p. 54-66, 2013.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.V.; BARROS, N.F. de; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. cap 7, p. 375-470.

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; RAMIREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P. High diversity of culturable Burkholderia species associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 345, p. 155-169, 2011.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v.2, . Brasília: CONAB, 2015, 33 p.

DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: Heinz, D.J. (Ed.) **Sugarcane improvement through breeding**. Amsterdam: Elsevier. Cap 2, 1987. p.7-84.

DE OLIVEIRA; R. I.; DE MEDEIROS; M. R. F. A.; FREIRE, C. S.; FREIRE, F. J.; SIMÕES NETO, D. E.; DE OLIVEIRA, E. C. A. Nutrient partitioning and nutritional requirement in sugarcane. **Australian Journal of Crop Science**. v. 10, n. 1, p. 69–75, 2016.

DIAS, M. O. de S.; MACIEL FILHO, R.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSELL, C. E. V.; BONOMI, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2014.

DO VALE, D. W.; DE M. PRADO; R., AVALHÃES; C. C.; HOJO, R. H. Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6 n. 2, p. 189–196, 2011.

DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Dext in the rhizosphere of sugarcane. **Plant and Soil**, v. 15, p. 211-217, 1961.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, Cidade, v. 44, n. 5, 1992. p. 310-313.

DOMMARGUES, Y.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, G.; PIERRETTE WEINHARD. Non-symbiotic nitrogen fixation in the rhizo-spheres of rice, maize and different tropical grasses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 83–89, 1973.

DOS SANTOS, R. L. **Molibdênio no metabolismo e na fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar**. 2014. 135 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

DURIGAN, J. C.; CORREIA, N. M.; TIMOSSI, P. C. Estádios de desenvolvimento e vias de contato e absorção dos herbicidas na inviabilização de tubérculos de *Cyperus rotundus*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 4, p. 621-626, 2005.

FAO. FAOSTAT - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 23 set. 2014.

FERNANDES, M. S. Nutrição mineral de plantas. 1ª ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. 432p.

GÓMEZ-MERINO, F. C.; TREJO-TÉLLEZ, L. I.; SENTÍES-HERRERA, H. E. Sugarcane as a Novel Biofactory: Potentialities and Challenges. In: Guevara-González and I. Torres-Pacheco (Ed.) **Biosystems Engineering: Biofactories for Food Production in the Century XXI**. Switzerland: Springer. Cap. 5, 2014. p. 129-149.

FRANCO, H.C.J.; OTTO R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, São Paulo, v.121, p. 29-41, 2011.

FRIED, M.; BROESHART, H. An independent measurement of the amount of Nitrogen Fixed by a legume crop. **Plant and Soil**, v. 43, p. 707-711, 1975.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, São Paulo, v. 36, p. 2086–2097, 2008.

GOMES, A. A.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R. Relação entre distribuição de nitrogênio e colonização por bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, v. 40, n. 11, p. 1105-1113, 2005.

HARDY, R.; BURNS, R.; HOLSTEN, R. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, p. 47-81, 1973.

JAMES, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. **Field Crops Research**, v. 65, p. 197-209, 2000.

JENSEN, H.L.; PETERSEN, E.J.; DE, P.K.; BHATTACHARYA, R. A New nitrogen-fixing bacterium: *Derxia gummosa* nov. gen. nov. spec. **Archiv für mikrobiologie**, v. 36, p. 182-195, 1960.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M.N. Plant and Endophyte Relationships: Nutrient Management. **Comprehensive Biotechnology** (Second Edition). Canada, v.4, p. 713–727. 2011.

KORNDÖRFER, G. H.; MARTINS, M. Importância da adubação na qualidade da cana-de-açúcar. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 10, n. 3, p. 26-31, 1992.

LAMB, T.G.; TONKYN, D.W.; KLUEPFEL, D.A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from rizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbioly**, U.S.A., v.42, p.1112- 1120, 1996.

LE COUTEUR, P.; BURRESON, J. **Os botões de Napoleão**: as 17 moléculas que mudaram a história. 1ª ed. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2006. 344 p. 2. v.

LIMA, D. R. M. de. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012.

LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Quantification of Biological Nitrogen Fixation associated with sugar cane using a <sup>15</sup>N aided nitrogen balance. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 165–170, 1987.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The Acetylene - Ethylene Assay for N<sub>2</sub> Fixation: Laboratory and Field Evaluation. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1185–1207, 1968.

OLIVEIRA, C. A. de. **Estimativas da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por  $\delta^{15}\text{N}$** . 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas. Brasil. 2012.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA DE DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO – RIDESA. Catálogo nacional de variedades “RB” de cana - de - açúcar. **RIDESA**, Curitiba, 136 p. 2010.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T.; GILLIS, M.; HOSTE, B.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. *Azoarcus* gen. nov., Nitrogen-Fixing Proteobacteria Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and Description of Two Species, *Azoarcus indigenssp. nov.* and *Azoarcus communis sp. Nov.* **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 43, p. 574-584, 1993.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Fixação biológica do nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.) *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368p.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAI, J. Diazotrophic Bacteria Associated To Roots of Sugarcane : Inorganic Phosphate Solubilization and the Salinity Tolerance. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 142–149, 2012.

SCHULTZ, N.; DE MORAIS, R. F.; DA SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P., LEITE; J. M.; PEREIRA, W. CARNEIRO JÚNIOR, J. DE B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47 n. 2, p. 261–268, 2012.

SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R.; RIBBE, M. W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 839-847, 2009.

SECEX/MDIC. Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Balança comercial Brasileira**. Diversos números. Disponível em: < <http://www.desenvolvimento.gov.br>>.

SELDIN, L.; ROSADO, A.S.; CRUZ, D.W.; NOBREGA, A.; VAN ELSAS, J.D.; PAIVA, E. Comparison of *Paenibacillus azotofixans* Strains Isolated from Rhizoplane, Rhizosphere, and Non-Root Associated Soil from Maize Planted in Two Different Brazilian Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 3860–3868, 1998.

SHEARER, G.; KOHL, D.H. N<sub>2</sub> fixation in field settings: estimations based on natural <sup>15</sup>N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 13, p. 699-756, 1986.

SILVESTER, W. B.; BENNETT, K. J. Acetylene reduction by roots and associated soil of New Zealand conifers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 171–179, 1973.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.

TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two

species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, v. 24, p. 976-980, 1978.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 35–49, 2012.

TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; FERREIRA, D. A.; VITTI, A. C.; FORTES, C.; FARONI, C. E.; OLIVEIRA, E. C. A.; CANTARELLA, H. Impact of sugarcane trash on fertilizer requirements for São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 5, p. 345–352.

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

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. DE; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA E SÁ, J.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5–21, 2012.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F. de; BATISTA, R.B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J. e M.; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A.S. de; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data of the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5-21, 2011.

USDA - United States Department of Agriculture. 2015. Disponível em: <[www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome](http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdahome)> Acesso em: 12 nov. 2015.

VIDEIRA, S. S. Estudo da comunidade de bactérias diazotróficas associadas a plantas de capim elefante. 2012. 121 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

WANG, L.; QUICENO, R.; PRICE, C.; MALPAS, R.; WOODS, J. Economic and GHG emissions analyses for sugarcane ethanol in Brazil: Looking forward. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 40, p. 571–582, 2014.

YABUUCHI, E.; KOSATO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (PALLERONI e HOLMES, 1981) comb. Nov. **Microbiology and Immunology**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

---

**CAPÍTULO I**

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO NA CANA-DE-  
AÇÚCAR: ESTUDO COMPARATIVO DAS ESPÉCIES REFERÊNCIA**

---

## CAPÍTULO 1:

### FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N<sub>2</sub> ATMOSFÉRICO NA CANA-DE-AÇÚCAR: ESTUDO COMPARATIVO DAS ESPÉCIES REFERÊNCIA

#### RESUMO

A investigação da fixação biológica do nitrogênio (FBN) nas plantas cultivadas se destaca na agricultura de baixo carbono em virtude do efeito passivo ambiental, com a redução do consumo dos adubos nitrogenados não renováveis e nas emissões dos gases do efeito estufa. Para quantificar o N<sub>2</sub> fixado, a técnica da diluição do isótopo <sup>15</sup>N é a mais utilizada. Na cana-de-açúcar, as dificuldades de determinar FBN quando se utiliza o método da diluição isotópica do <sup>15</sup>N, provém da dificuldade de obter uma espécie controle não fixadora para quantificar a contribuição, uma vez que as espécies atualmente utilizadas possuem fisiologia de crescimento e mecanismos de absorção do N distintos ao da cana-de-açúcar, além de também realizarem simbiose ou associações com microrganismos fixadores, o que reduz a confiabilidade dos resultados atualmente encontrados. Diante do contexto, esta pesquisa tem o objetivo avaliar a contribuição da FBN na cana-de-açúcar e em espécimes de plantas comumente utilizados como planta referência. O estudo foi conduzido em casa de vegetação, utilizando vasos com areia lavada enriquecida a 2% de átomos de <sup>15</sup>N em excesso. Os tratamentos foram constituídos dos espécimes capim colônia (*Panicum maximum* L.), tiririca (*Cyperus rotundus* L.) e sorgo (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench) em comparação com a cana-de-açúcar na ausência do N e adubada com ureia enriquecida a 2% de átomos de <sup>15</sup>N, em dois tempos distintos de avaliação. Assim, os tratamentos foram dispostos em delineamento inteiramente casualizados, com quatro repetições. As espécies de capim colônia e tiririca não são recomendadas para utilização como espécies controle em estudos de FBN para plantas não leguminosas, visto que houve contribuição significativa da FBN nessas plantas. A cana-de-açúcar adubada com N e o sorgo foram consideradas as melhores plantas para serem utilizadas como referência em estudos de FBN na cana-de-açúcar, devido a menor diluição isotópica e menor atividade da AN.

**Palavras chave:** Diluição isotópica, Abundância natural, Cana-de-açúcar, Bactérias diazotróficas.

## ABSTRACT

The investigation of Biological Nitrogen Fixation (BNF) in crops excels in low carbon agriculture because environmental passive effect, by reducing the consumption of non-renewable nitrogen fertilizers and emissions of greenhouse gases. To quantify the fixed  $N_2$ , the  $^{15}N$  isotope dilution method is the most used. In sugarcane, difficulties in determining BFN when using the method of isotopic dilution  $^{15}N$  comes from the difficulty of obtaining a sort control does not fixative to quantify the contribution, since the currently used species have growth physiology and N distinct absorption mechanisms of the sugarcane, and also perform or symbiotic associations with fixing microorganisms, which reduces the reliability of the results currently found. On the context, this research aims to assess the contribution of BNF in sugarcane and plant specimens commonly used as a reference plant. The study was conducted in a greenhouse using pots with soil enriched to 2% excess  $^{15}N$  atoms. The treatments consisted of guinea grass (*Panicum maximum* L.), purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) compared to sugarcane in the absence of N and fertilized with urea enriched to 2%  $^{15}N$  atoms, in two different times. Thus, the treatments were arranged in a completely randomized design with four replications. The guinea grass and the purple nutsedge are not recommended as species control FBN studies to non-leguminous plants, since there was a significant contribution of BNF in these plants. The sugarcane fertilized with N and sorghum were considered the best plants in reference FBN studies on sugarcane due to lower isotope dilution and lower activity of AN.

**Key words:** Isotope dilution, Natural abundance, Sugarcane, Diazotrophs.

## INTRODUÇÃO

As bactérias diazotróficas são organismos procariotos capazes de fixar o N<sub>2</sub> atmosférico e torná-lo disponível às plantas. Quando se associam as plantas, essas bactérias são capazes de estabelecer simbioses ou colonizar endofiticamente os tecidos vegetais de forma a se beneficiar dos fotossimilados produzidos e compartilhar o nitrogênio fixado (JOHNSTON-MONJE & RAIZADA, 2011).

Para avaliar a FBN por essas bactérias diversas técnicas têm sido utilizadas, entre elas os métodos de redução do acetileno e da diluição do isótopo estável <sup>15</sup>N são os amplamente difundidos. A redução do acetileno é utilizada para avaliar a atividade do complexo proteico nitrogenase, enzima responsável pela catalisação da reação da FBN (HARDY et al., 1968). Contudo, apesar de ter boa reprodutibilidade e ser bastante sensível à reação, o método é semiquantitativo em virtude da necessidade de usar um fator de equivalência para expressar os resultados da redução de acetileno em quantidade de N assimilado via FBN (DOMMERGUES et al., 1973; HARDY et al., 1973; SILVESTER & BENNETT, 1973).

Como alternativa, a avaliação da diluição do isótopo estável <sup>15</sup>N permite a melhor compreensão do sistema solo-planta-atmosfera de modo a obter a quantificação da FBN na cultura. Taulé et al. (2012) utilizando a técnica de marcação do solo em três variedades de cana-de-açúcar obtiveram valores de porcentagem de excesso de átomos <sup>15</sup>N nas folhas +3 significativamente mais baixas que o milho e o sorgo utilizados como plantas referência em taxas de fertilizantes de 10 e 50 mg kg<sup>-1</sup>.

Em plantas não leguminosas como a cana-de-açúcar, estudos que utilizaram a técnica da abundância natural do <sup>15</sup>N, tem demonstrado que FBN pode contribuir com até 51% do nitrogênio absorvido e que as plantas inoculadas apresentam produtividade semelhante ou até maior em comparação as adubadas com N (URQUIAGA et al., 2011). No entanto, a confiabilidade desses resultados pode ser contestada, em virtude da limitação em quantificar a FBN na cana-de-açúcar em campo, quando as espécies não fixadoras atualmente utilizadas como planta referência possuem fisiologia de crescimento e mecanismos de absorção do N distintos ao da cana-de-açúcar, além de possivelmente também realizarem simbiose ou associações com microorganismos fixadores do N<sub>2</sub>.

Atualmente, várias espécies de ervas daninhas são utilizadas como espécies referências, principalmente a tiririca (*Cyperus rotundus* L.), por sua maior distribuição em ambientes agrícolas e adaptação aos diversos tipos de ambientes (DURIGAN et al., 2005). Além da tiririca, outras plantas como o sorgo (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench), o

painço (*Panicum miliaceum* L.), milheto (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Brow), o milho (*Zea mays* L.), o capim colonião (*Panicum maximum* L.), o repolho (*Brassica oleracea capitata* L.) e o azevém (*Lolium perene* L.) (BAPTISTA et al., 2014; OLIVEIRA, 2012; SCHULTZ et al., 2012; TAULÉ et al., 2012) também são cultivadas com o intuito de serem utilizadas como culturas que não apresentam contribuição do N<sub>2</sub> atmosférico pela fixação. Contudo, essas espécies exibem bom desenvolvimento sem adubação nitrogenada, o que indica contribuição da FBN e tornam seu uso inadequado para a técnica da abundância natural como espécimes referência.

Segundo Boddey (1987) a planta controle e a planta fixadora devem ter a mesma marcha de absorção para o N. Alves et al. (2006) discorrem que as diferenças de distribuição e volume de raízes afetam os mecanismos de absorção e torna problemático a utilização do método. Neste contexto, o método mais confiável para quantificar a FBN na cana-de-açúcar deve utilizar a própria cultura da cana-de-açúcar como planta referência, principalmente quando se está testando o potencial de novas estirpes de bactérias para inoculação.

Para tanto, quando o solo for homogeneamente enriquecido com <sup>15</sup>N e a cana-de-açúcar for adubada com fertilizante enriquecido com esse isótopo na mesma abundância, como exemplo da utilização do solo em lisímetro, os valores percentuais do <sup>15</sup>N nos tecidos das plantas será muito semelhante a marcação do solo e haverá menor contribuição da FBN. Nas plantas de cana-de-açúcar não adubadas com N, haverá a diluição isotópica do <sup>15</sup>N, o que permitirá quantificar a fixação biológica do N<sub>2</sub>. Na medida em que a FBN aumentar, o valor da abundância do <sup>15</sup>N nos tecidos da planta tende a zero (BALDANI et al., 2009).

Identificar nas plantas consideradas referência a contribuição N<sub>2</sub> fixado da atmosfera, possibilitará selecionar os espécimes mais adequados para estudos que quantificam a FBN na cana-de-açúcar. Em adição, se a adubação nitrogenada inibir a FBN na cana-de-açúcar será possível utilizar a própria planta de cana como referência, o que trará maior confiabilidade aos resultados de estudos sobre fixação de N<sub>2</sub>, bem como será possível padronizar um método mais confiável para estimar a contribuição da FBN em plantas não leguminosas.

Neste contexto, esta pesquisa teve o objetivo de avaliar o potencial de fixação do N<sub>2</sub> da atmosfera na cana-de-açúcar e nos espécimes comumente mais utilizados como planta referência por meio do método do enriquecimento da abundância natural do <sup>15</sup>N no solo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 3. EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO

#### 3.1. Condução experimental

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, situada na cidade do Recife, Estado de Pernambuco com coordenadas geográficas 8° 1' 0,4'' Sul e 34° 56' 41'' Oeste. O estudo foi conduzido no período de 31/07/2015 a 08/11/2015 o que totalizou 100 dias avaliação experimental.

O clima da região segundo a classificação de Koppen (1948) enquadra-se no macroclima Am - clima tropical chuvoso, no qual a temperatura média do mês mais frio é superior à 18° C e à do mês mais quente superior à 22 °C. As chuvas são mais abundantes no inverno e escassas no verão com média anual de precipitação superior a 1.500 mm.

Os tratamentos foram constituídos da cana-de-açúcar sem adubação nitrogenada e adubadas com ureia enriquecida com 2% de átomos de <sup>15</sup>N em excesso e três espécimes de referência S - sorgo (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench), C - capim colônia (*Panicum maximum* L.) e T - tiririca (*Cyperus rotundus* L.), avaliadas em dois tempos de crescimento distintos para a cana-de-açúcar e para as plantas referência. Os tratamentos foram distribuídos em delineamento inteiramente casualizados, com 4 repetições, totalizando 20 parcelas experimentais.

Os tempos de avaliação da cana-de-açúcar foram identificados com base nos resultados de Santos (2014) que observou aos 50 e 100 dias após o plantio (DAP) o início e a máxima atividade da nitrogenase e da FBN, respectivamente. Nos espécimes referencias, que apresentam ciclo de crescimento mais curto, foram selecionados dois períodos identificados como início e final da fase vegetativa de crescimento (DURIGAN et al., 2005; NETO et al., 2009; GOMIDE et al., 2003).

As parcelas experimentais consistiram em vasos de com capacidade de 50 L, que totalizou 0,050 m<sup>3</sup>, espaçados em 1,2 m. Na parte inferior central dos vasos, foram instalados drenos que apresentavam diâmetro de 2,5 cm<sup>2</sup>, com objetivo de não saturar o solo da parte inferior do vaso e reutilizar a solução nutritiva na irrigação posterior. Na base interna dos vasos, acima do dreno, foi utilizada uma tela de plástico perfurada e

posteriormente foram adicionados 4 cm de brita cascalhinho (nº 12) e solo calculado para massa total totalizando 74 kg.

Como substrato de crescimento, foi utilizado areia lavada, com textura muito arenosa, pobre em matéria orgânica e nutrientes, de modo que a fonte principal de N para as plantas fossem o adubo nitrogenado ou o N<sub>2</sub> atmosférico. A caracterização química e física do solo foi realizada em três amostras compostas oriundas de nove amostras simples coletadas aleatoriamente (Tabela 1).

**Tabela 1** - Caracterização química e física do solo e do extrato da pasta saturada (após correção do solo).

<b>Atributos químicos</b>		<b>Extrato da pasta saturada</b>	
pH (H <sub>2</sub> O)	5,48	pH (H <sub>2</sub> O)	7
Carbono orgânico (g kg <sup>-1</sup> )	1,78	C.E (dS m <sup>-1</sup> )	2,77
Fósforo (mg dm <sup>-3</sup> )	1,1	Cálcio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	33,85
Zinco (mg dm <sup>-3</sup> )	1,96	Magnésio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	1,77
Ferro (mg dm <sup>-3</sup> )	30,3	Sódio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	77,19
Manganês (mg dm <sup>-3</sup> )	1,56	Potássio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	13,83
Cobre (mg dm <sup>-3</sup> )	0,15	RAS	13,09
Cálcio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,006	<b>Atributos físicos</b>	
Magnésio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,008	Areia grossa (g kg <sup>-1</sup> )	826,4
Alumínio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,42	Areia fina (g kg <sup>-1</sup> )	138,4
Potássio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,382	Silte (g kg <sup>-1</sup> )	17,6
Sódio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,138	Argila (g kg <sup>-1</sup> )	17,7
H + Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,052	Ds (g cm <sup>-3</sup> )	1,69
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,534	Dp (g cm <sup>-3</sup> )	2,66
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,954	PT (%)	51,13
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,586	Classe textural	Arenosa
m (%)	14,22	θ <sub>cc</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	0,12
V (%)	70,66	θ <sub>pmp</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	0,03
PST (%)	59,62		

SB: Soma de bases; t: CTC efetiva; T: CTC potencial; <sup>15</sup>N: Porcentagem de <sup>15</sup>N na folha +1; m: Saturação por alumínio; V: Saturação de bases; PST: Porcentagem de sódio total; C.E: Condutividade elétrica; RAS: Relação de adsorção de sódio; Ds: Densidade do solo; Dp: Densidade de partículas; PT: Porosidade total; θ<sub>cc</sub>: Umidade na capacidade de campo; θ<sub>pmp</sub>: Umidade no ponto de murcha.

Para caracterização química e física, as amostras de solo foram secas ao ar (Terra Fina Seca ao Ar - TFSA) e passadas em peneiras com malha de 2,0 mm. Para a análise

de matéria orgânica, foi necessário realizar a maceração do material até passar em peneiras de 0,5 mm. Na análise química foi determinado o pH em água,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{H+Al}$ ,  $\text{P}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e COT (carbono orgânico total).

O  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e o  $\text{Al}^{3+}$  foram extraídos com  $\text{KCl}$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ), no qual o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$  foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o alumínio por titulometria. O  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{P}$ ,  $\text{Fe}$ ,  $\text{Cu}$ ,  $\text{Zn}$  e  $\text{Mn}$  foram extraídos via solução de Mehlich<sup>1</sup>, no qual o  $\text{K}^+$  e  $\text{Na}^+$  foram determinados por fotometria de chama, o  $\text{P}$  por espectrofotometria e os demais foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. A acidez potencial ( $\text{H} + \text{Al}$ ) foi extraída em acetato de cálcio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e dosada por titulometria.

Todos os procedimentos metodológicos seguiram a metodologia descrita em EMBRAPA (1999), apenas o COT foi determinado por titulometria segundo o método de Walkley-Black Modificado (WALKLEY & BLACK, 1934; EMBRAPA, 1999). Com os resultados das análises químicas foram calculados a soma de bases (SB), CTC efetiva (t), CTC potencial (T), saturação por alumínio (m), saturação por bases (V) e saturação por sódio (PST).

Para as análises físicas, foram realizadas avaliações de granulometria, densidade de solo, densidade de partículas e porosidade total. Para a determinação da textura, a fração areia foi seca em estufa a  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  e separada via tamisação em peneiras 0,2 mm e 0,053 mm para obter as frações areia grossa e areia fina. A fração argila foi determinada pelo método do hidrômetro descrito por Bouyoucos (1926) e o silte obtido por diferença.

Na determinação da densidade do solo foi utilizado o método do anel volumétrico (EMBRAPA, 1997). A densidade de partículas foi determinada pelo método do balão volumétrico (KIEHL, 1979; EMBRAPA, 1997). Para a determinação da porosidade total do solo foi utilizado a curva característica de retenção de água no solo (CCRAS).

### **3.2. Correção do solo**

Após a caracterização química do solo, realizou-se a correção da acidez, utilizando calcário dolomítico (35,70% de  $\text{CaO}$ ; 14,44% de  $\text{MgO}$ ; 69,90% de PRNT) na dose equivalente a  $4 \text{ Mg ha}^{-1}$ . A necessidade de calagem foi calculada conforme Sousa e Lobato (2004) pelo método da neutralização da acidez trocável e elevação dos teores de  $\text{Ca}$  e  $\text{Mg}$  trocáveis.

Em adição ao calcário, foi adicionado dose equivalente a 7,5 Mg ha<sup>-1</sup> de gesso mineral (26,60% de CaO e 2,49% de MgO; 7,02% de PRNT), com o propósito de reduzir a saturação de sódio do solo para 8,5%, conforme o método da porcentagem de sódio trocável. O calcário e gesso, foram incorporados de forma homogênea e toda a massa de solo foi envolta por lona e incubada durante 15 dias. Após esse período, o solo foi reavaliado, apresentando faixa de pH em água acima de 5,5.

Após a incubação do solo com os corretivos, foi realizada a extração da solução do solo ao vácuo e determinado os cátions em solução e da atividade do sódio após a gessagem (Tabela 1). Para a extração da pasta saturada foi utilizado a metodologia descrita por USSL & Staff (1954). Na caracterização da solução do solo foi determinado o pH em água no potenciômetro e a CE no condutivímetro. Os cátions de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> foram determinados por fotometria de chama. Com os resultados das análises foi calculada a Razão de Adsorção de Sódio na solução (RAS).

### 3.3. Enriquecimento do solo com <sup>15</sup>N

O solo foi enriquecido utilizando o fertilizante do tipo ureia com 2% de átomos de <sup>15</sup>N, produzido no Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP. Para cada parcela experimental foi adicionado a quantidade correspondente a dose de 10 kg ha<sup>-1</sup> de N, considerando a massa de solo de 74 kg. Deste modo, foram aplicados 0,23 g de N por parcela, (0,49 g ureia com 2% de átomos de <sup>15</sup>N por parcela).

Para facilitar a aplicação do fertilizante e a marcação do solo, a ureia foi diluída em água e formou-se uma solução de N-ureia com volume de 500 ml. O volume da solução foi calculado, conforme a capacidade de armazenamento da água no solo, de modo que não houvesse drenagem da solução após a aplicação e consequente perda do <sup>15</sup>N.

Para a aplicação da solução enriquecida com <sup>15</sup>N-ureia foi retirado 75% do volume de solo separadamente em cada parcela experimental, e a solução previamente preparada foi aos poucos sendo homogeneizada ao solo até que toda a massa de solo ficasse umedecida. Essa operação visou reduzir as perdas de N por volatilização da amônia, bem como, marcar homogeneamente todo o solo com o adubo.

Após a aplicação da solução, todos os vasos foram cobertos com lona plástica escura e incubados durante 30 dias. Esse processo visou elevar a abundância de  $^{15}\text{N}$  do solo, de modo que permanecesse superior quando comparado com da atmosfera (0,3663 %). Assim, todos os tratamentos receberam pequena quantidade de N, que não inibisse na associação das bactérias inoculadas com a cana-de-açúcar.

### **3.4. Plantio e semeio**

Para o tratamento cana-de-açúcar o plantio foi realizado com colmos sementes da variedade RB867515 obtidos da Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC/UFRPE), com 10 meses de crescimento. A RB867515 foi escolhida por ser a mais plantada nos canaviais brasileiros (RIDESA, 2015).

Para as plantas referência se utilizou sementes de sorgo forrageiro (*Sorghum Bicolor* (L.) Moench), da variedade F15, adquiridas no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no município de Recife, Pernambuco. Rizomas de capim colônia (*Panicum maximum* L.), da cultivar Massai foram coletados com 80 dias de cultivo e adquiridos da coleção de espécies forrageiras mantidas em canteiros no Departamento de Zootecnia da UFRPE, setor de forragicultura. Sementes de tiririca (*Cyperus rotundus* L.) foram coletadas próximas aos canteiros de capim colônia e identificada como predominante nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar.

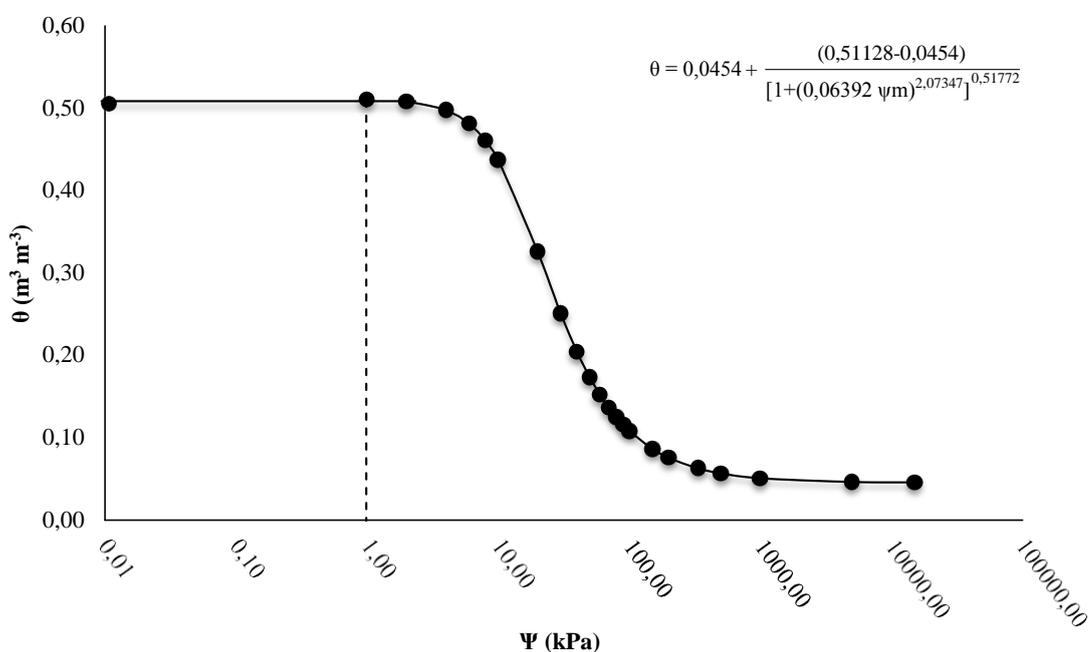
Os colmos sementes foram cortados de modo a permanecer com 20 cm e uma gema viável e plantados no período da manhã, sendo distribuídos quatro colmos por vaso, dispostos em dois sulcos com aproximadamente 0,20 m de profundidade e posteriormente foram cobertos com o solo do próprio vaso.

Para o semeio do sorgo e a tiririca foram feitas covas rasas (aproximadamente 10 cm de profundidade) e semeadas 14 sementes para o sorgo e seis sementes para a tiririca em cada vaso. Após a germinação, foi realizado o desbaste deixando apenas seis plantas. Para o capim colônia, foi feito o plantio do rizoma sem a retirada das folhas até a emergência das folhas mais novas. Após a emergência dessas folhas, foi realizado o desbaste a permanecer apenas as folhas mais novas.

### 3.5. Controle da umidade e irrigação

A umidade do solo foi mantida por meio de regas diárias aplicadas uma única vez no período correspondente do plantio até os 60 dias após a germinação (DAG). Após esse período, a manutenção da umidade do solo foi realizada com duas regas diárias, no início da manhã e no final da tarde, de modo que o solo permanecesse com umidade durante o dia e a noite. Quando ocorria drenagem da solução do solo, o volume drenando foi adicionado a irrigação posterior.

Para calcular o volume da solução de irrigação, foram instalados em cada vaso tensiômetros na profundidade de 30 cm, que com auxílio do tensímetro analógico e da CCRAS (Figura 1), o valor de tensão obtidos foi transformado em volume de água necessários para reposição da umidade próxima à 80 % capacidade máxima de adsorção de água do solo. Para determinar a a CCRAS foi utilizado procedimentos descritos por Leamer e Shaw, (1941) e Oliveira, (1968) para as tensões de tensões de 0, 10, 30, 60, 80 e 100 centímetros de coluna de água (cca) e por Klute (1986) para as tensões 333, 500, 1000, 5000 e 15000 cca.



**Figura 1** - Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ). Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten.

### **3.6. Adubação**

Para o manejo nutricional da cana-de-açúcar adubada com N, foi produzida uma solução constituída de N, utilizando como fonte a ureia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) enriquecida com 2 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ . Foi formulada uma solução com base na solução de Arnon & Hoagland (1950) que continha os demais macronutrientes e micronutrientes, com exceção do N.

A composição química dos nutrientes presentes na solução indicada pelos autores e utilizada no experimento foram para os macronutrientes de 31 g L<sup>-1</sup> para o fósforo, 234,6 g L<sup>-1</sup> para o potássio, 200,6 g L<sup>-1</sup> para o cálcio, 48,6 g L<sup>-1</sup> para o magnésio, 64,2 g L<sup>-1</sup> para o enxofre e para os micronutrientes 500 µg L<sup>-1</sup> para o boro, 20 µg L<sup>-1</sup> para o cobre, 648 µg L<sup>-1</sup> para o cloro, 5022 µg L<sup>-1</sup> para o ferro, 502 µg L<sup>-1</sup> para o manganês, 50 µg L<sup>-1</sup> para o zinco.

A primeira aplicação da solução nutritiva foi realizada aos 12 dias após a germinação (DAG), quando mais 50 % das plantas haviam germinado. Foram aplicados 250 mL de cada solução duas vezes por semana, com intervalos de três dias até o final do ciclo. Para que todas as plantas tivessem a mesma quantidade de solução aplicada, foi adicionada uma quantidade de água para completar o volume de 2L. Nesses intervalos, era realizada a irrigação das plantas. A aplicação foi realizada com regadores de capacidade de 1L na superfície do solo.

O pH e a condutividade elétrica (CE) das soluções foram monitoradas antes de cada aplicação, de modo que permanecessem respectivamente acima de 5,5 e abaixo de 2,0 dS m<sup>-1</sup>. Durante a realização do ensaio experimental, os valores de pH (6,2 a 6,8) e CE (1,2 a 1,9 dS m<sup>-1</sup>) das soluções nutritivas foram permaneceram abaixo do limite máximo permitido, não necessitando ajuste.

## **4. ANÁLISES LABORATORIAIS**

### **4.1. Avaliação da nitrogenase**

A atividade da enzima nitrogenase (AN) foi determinada na cana-de-açúcar, aos 50 e 100 DAG e nas plantas de referências, aos 30 e 45 DAG. Na cana-de-açúcar, sorgo e capim colônia a AN foi determinada utilizando uma folha diagnóstico (folha +1) por parcela. Esta folha foi identificada como a folha mais jovem que apresenta o colarinho e

a lígula visível (RAIJ et al., 1996). Na tiririca foi utilizada a planta inteira para a análise conforme trabalho realizado por Santos (2014).

As amostras de tecido vegetal coletadas foram acondicionadas em frascos de vidro de 750 mL hermeticamente fechados contendo um anel de vedação de borracha no centro. Com auxílio de uma seringa volumétrica de 100 ml, foram retirados 90 ml do ar contido no frasco, e em seguida, foram adicionados 90 ml do gás acetileno (99,8% de C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>), que permaneceu no frasco durante uma hora, para que houvesse a redução acetileno e a produção do etileno. Após o tempo decorrido, foram retirados, com o uso de outra seringa volumétrica menor, 9 ml da atmosfera dos frascos e armazenados em tubos “vacutainer” de 9 ml. Para obtenção da massa seca da folha utilizada na análise, o tecido vegetal foi levado à estufa de circulação forçada de ar (60 °C) até atingir peso constante. Quando secas, as amostras foram pesadas em balança analítica.

A produção de etileno foi determinada por cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo acoplado a coluna PORAPAK N empacotada e com a temperaturas de forno, injetor e detector de ionização de chama, respectivamente, aos 70, 130 e 150 °C. As vazões de N<sub>2</sub> (gás de arraste), H<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> apresentavam-se em 30, 30 e 300 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim, atividade da enzima nitrogenase foi calculada pela equação 1 (BODDEY et al., 2007):

$$AN = \frac{(E_1 - E_2) \times V \times K_e}{244,50 \times S_e \times t \times m} \quad [E1]$$

Nesta equação, AN representa a atividade da nitrogenase em mmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>; E<sub>1</sub> é a área do pico de etileno na amostra inicial; E<sub>2</sub> é a área do pico do etileno na amostra final; o V o volume do frasco em mL; o K<sub>e</sub> representa a concentração do pico de etileno padrão em mg L<sup>-1</sup>; S<sub>e</sub> é a área do pico de etileno padrão; o "t" é o tempo de incubação em horas e "m" a massa do tecido vegetal em g.

#### 4.2. Produção de biomassa

Após a coleta da AN, plantas foram cortadas rente ao solo e, logo em seguida, pesadas e levadas à estufa de circulação forçada de ar para a secagem até atingirem peso

constante (60 °C/72 horas). Posteriormente, as mesmas foram pesadas para a obtenção da matéria seca da parte aérea em g planta<sup>-1</sup>.

### 4.3. Estimativa da fixação biológica do N<sub>2</sub>

Nos mesmo tempos de avaliação e nos mesmos tecidos vegetais utilizados para determinar AN, foi quantificada a abundância de átomos de <sup>15</sup>N e o teor de N total. As amostras das folhas após serem utilizadas para determinar AN, foram acondicionadas em sacos de papel e pesadas, em seguida foram secas em estufa de circulação forçada de ar à 60 °C e posteriormente moídas em moinho tipo bolas TE-350 TECNAL até se apresentarem na forma de pó fino e passadas em peneira com malha de 0,595 mm (30 mesh). A abundância de átomos de <sup>15</sup>N e o N total das no material vegetal das plantas foram determinados em espectrômetro de massa acoplado com analisador de N, modelo ANCA-GSL do Laboratório de Isótopo Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP.

Para o cálculo do percentual do nitrogênio derivado da fixação (% Ndffix), foi utilizada a relação entre a abundância do átomo de <sup>15</sup>N nos tratamentos e os valores de <sup>15</sup>N encontrados na planta referência (Equação 2). Para o presente estudo, a cana-de-açúcar adubada com N foi considerada a planta controle mais adequada em virtude de sua menor diluição isotópica, ou seja, a porcentagem de átomos de <sup>15</sup>N foi semelhante a marcação do solo, estimada em 2 % (Tabela 2).

$$\% \text{ Ndffix} = \left[ 1 - \frac{(\% A^{15}\text{N}_{\text{excesso}})_{\text{cultura}}}{(\% A^{15}\text{N}_{\text{excesso}})_{\text{cana N}}} \right] \times 100 \quad [\text{E2}]$$

Na equação 2, a %Ndffix é a porcentagem do N derivado da fixação; o % A<sup>15</sup>N<sub>cultura</sub> é a abundância de <sup>15</sup>N na cultura em estudo e o % A<sup>15</sup>N<sub>cana N</sub> é a abundância de <sup>15</sup>N na planta controle.

Para calcular a quantidade de N derivado fixação (QNdffix) em mg planta<sup>-1</sup>, foi utilizado o produto dos teores de NT das plantas (%) e da biomassa seca da parte aérea (BSPA) de cada planta avaliada (mg planta<sup>-1</sup>) (Equação 3). Assim, posteriormente pode ser calculada a QNdffix a partir do produto da %Ndffix e QNT das plantas em estudo (Equação 4).

$$QNT = \frac{N \times BSPA}{100} \quad [E3]$$

$$QNdfix = \frac{\%Ndfix \times QNT}{100} \quad [E4]$$

Como as culturas em estudo podem obter N do solo e da atmosfera, assume-se que o N total na planta será a soma do percentual do N derivado do solo e da fixação biológica do N<sub>2</sub> atmosférico. Dessa forma, foi possível obter o percentual do N derivado do solo (% Ndfsolo) a partir do cálculo da diferença entre 100 % e a %Ndfix (Equação 5).

$$\%Ndfsolo = 100 - \%Ndfix \quad [E5]$$

Para cálculo da quantidade de N derivado do solo (QNdsolo) em mg planta<sup>-1</sup>, foi utilizada a equação 5, no qual a variável QNdsolo foi obtida a partir do produto da %Ndfsolo e QNT das plantas (Equação 5).

$$QNdsolo = \frac{\%Ndsolo \times QNT}{100} \quad [E5]$$

#### 4.4. Análises estatísticas

Os resultados foram analisados quanto aos critérios de distribuição normal e homocedasticidade dos dados e quando necessário foi realizada a transformação. Posteriormente os dados que apresentaram distribuição normal e homocedásticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em delineamento inteiramente casualizados, utilizando-se o conceito de medidas repetidas do programa computacional estatístico SAS. Para escolha da matriz de variância e covariância foi utilizado o Critério de Informação de Akaike ( $-2l + 2d$ , em que  $l$  denota o valor da máxima verossimilhança, em log, e  $d$  denota a dimensão do modelo), selecionando-se a que possuiu menor valor para este parâmetro (AKAIKE, 1974). Foram testadas 16 estruturas da matriz de variância e covariância. O efeito isolado ou da interação das variáveis no tempo, quando

significativos, tiveram as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey-Kramer ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o software SAS version student 2.0 (1991).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A abundância de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos das plantas variou entre as fases crescimento vegetativo apenas para as plantas de tiririca e cana-de-açúcar não adubada com N, em que se observou redução de 0,20% e 0,63% respectivamente na segunda fase crescimento (Tabela 2). Esse resultado evidencia que a restrição do N estimula na cana-de-açúcar associações simbióticas com bactérias fixadoras do  $\text{N}_2$  atmosférico, principalmente nos estágios vegetativos mais avançados, o que pode ser corroborado com os incrementos significativos de 98,1 % na AN para essa fase de crescimento (Tabela 2).

Na primeira fase de crescimento (FV1), a abundância de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos do sorgo, tiririca, da cana-de-açúcar com e sem N não apresentaram diferença e foram superiores a observada no capim colônia (Tabela 2). Na segunda fase (FV2), a cana-de-açúcar que recebeu o N e o sorgo apresentaram a menor diluição do isótopo  $^{15}\text{N}$ , enquanto que a cana-de-açúcar sem N e o capim colônia as maiores (Tabela 2). A menor diluição do  $^{15}\text{N}$  nos tecidos da folha demonstram que a associação das bactérias diazotróficas com cana-de-açúcar adubada (CCN) e na cultura do sorgo foi pequena e a fixação biológica é quase nula, visto que a abundância de  $^{15}\text{N}$  nesses espécimes foram próximos ao do solo, estimado em 2%.

A aplicação do adubo nitrogenado reduziu a diluição de  $^{15}\text{N}$  na cana-de-açúcar em aproximadamente 0,32 % e 1,03% quando comparada a cana sem a aplicação do adubo na fase FV1 e FV2 respectivamente. Quando comparada com o sorgo, a diluição do  $^{15}\text{N}$  da CSN foi em média, 0,16% e 0,74% superior respectivamente em ambos tempos de avaliação.

Em experimento desenvolvido no norte do Uruguai, Taulé et al. (2012) realizaram a marcação do solo com doses crescentes de N em vaso e avaliaram a contribuição da FBN em variedades de cana-de-açúcar aos 120 DAG. Os autores utilizaram a cultura do sorgo e do milho como referência para a técnica de diluição isotópica e observaram que os maiores concentrações de  $^{15}\text{N}$  foram encontrados na cultura do sorgo quando comparado à cultura do milho e da cana-de-açúcar nas doses de 10 e 50  $\text{mg kg}^{-1}$  de fertilizante. Dessa forma, a cultura do sorgo apresenta-se como cultura referência da técnica de abundância, visto que dentre as culturas utilizadas, apresentou maior teor de  $^{15}\text{N}$ .

Brito et al. (2010) avaliando os efeitos de doses de nitrogênio, na forma de ureia, sobre a FBN em feijão comum e caupi, pela técnica isotópica em experimento de casa de vegetação, encontrou que a porcentagem de nitrogênio proveniente da fixação simbiótica nas duas variedades decresceu proporcionalmente ao incremento da dose de N, demonstrando que a presença do N na solução do solo desfavoreceu o processo de simbiose. Da mesma forma, Araújo, et al. (2015) avaliando os efeitos da inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em associação com a adubação nitrogenada em plantas de milho observaram que a porcentagem de N proveniente do fertilizante na parte aérea da cultura foi maior conforme o aumento da dose do fertilizante nitrogenado o que demonstra uma redução do incremento da FBN na cultura.

Giller, et al., (1986) em pesquisa de diluição isotópica e FBN em sorgo cultivado em vermiculita com rega de solução marcada com  $^{15}\text{N}$ , observaram diluição isotópica de 613 a 27% entre as variedades de sorgo estudadas quando comparadas ao genótipo de menor diluição isotópica e menor AN. Esse resultado é semelhante ao encontrado neste estudo, em que ocorreu diluição de 12,84% no sorgo quando comparado à CCN.

**Tabela 2** - Abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$ , acúmulo do N total na parte aérea (QNT) e atividade da enzima nitrogenase (AN) para os espécimes utilizados como referência e para cana-de-açúcar adubada e não adubada com N, em diferentes fases de crescimento.

Fator	$^{15}\text{N}$ % átomos		QNT mg planta <sup>-1</sup>		AN μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>	
	FV1	FV2	FV1	FV2	FV1	FV2
Colonião	0,94 aC	0,95 aC	54,99 aB	59,96 aB	342,37 aA	232,28 aB
Tiririca	1,26 aB	1,06 bC	49,14 aB	26,19 bC	208,37 aB	76,98 bC
Sorgo	1,59 aAB	1,54 aB	15,86 aC	15,34 aCD	156,46 aC	150,77 aBC
Cana (CSN)	1,43aB	0,80 bD	53,44 aB	13,17 bD	259,86 bAB	514,82 aA
Cana (CCN)	1,75 aA	1,83aA	161,53 bA	351,45 aA	111,90 aC	151,90 aBC
	F		F		F	
Tratamento	53,68*		340,63*		55,80*	
Tempo	63,98*		1,31 <sup>ns</sup>		0,15 <sup>ns</sup>	
Trat*Tempo	30,58*		50,07*		15,53*	
AIC	-36,8		10,7		26,3	
Modelo	AR(1)		VC		ANTE (1)	

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \*significativo a 1% probabilidade. FV1: Primeira fase vegetativa das culturas (Sorgo, Capim colonião e Tiririca: 30 DAG; Cana-de-açúcar 50 DAG); FV2: Segunda fase vegetativa das culturas (Sorgo, Capim colonião e Tiririca:45 DAG; Cana-de-açúcar: 100 DAG). CSN: Cana-de-açúcar sem adubação nitrogenada; CCN: Cana-de-açúcar adubada com N. AIC: Critério de informação de Akaike - AR (1): Autoregressive First Order; VC: Variance Components; ANTE (1): Ante-Dependence.

A AN apenas obteve diferença entre a primeira e segunda fase de crescimento na tiririca que reduziu em 63 % e na cana-de-açúcar sem aplicação do adubo nitrogenado

(CSN) que se constatou aumento de 98 % (Tabela 2). Segundo Durigan et al. (2005) dos 35 aos 45 dias após a germinação, a tiririca apresenta altura variando entre 20 a 25 cm e quantidade de folhas entre 5 a 7 o que determina o início do estágio de pré florescimento. Nessa fase final de crescimento vegetativo e início da maturação, a atividade das bactérias possivelmente deve ser menor, o que levaria aos baixos valores da AN, devido à redistribuição do N fixado e assimilado para órgãos reprodutivos da planta.

Na CSN a segunda fase de crescimento foi avaliada foi aos 100 DAG, que segundo Oliveira et al. (2010) corresponde ao início do maior crescimento vegetativo, o que pode ter estimulado a associação simbiótica pela planta com a população nativa de bactérias diazotróficas existentes no rebole e no solo, aumentando a AN. A menor AN aos 50 DAG (FV1) pode ser explicada em função da maior contribuição do N do rebole na nutrição nitrogenada da cana planta, que não estimularia a associação com as bactérias fixadoras de N. Os comportamentos da AN na cana-de-açúcar sem N foram semelhantes aos encontrados por Santos (2014) que também verificou maior atividade enzimática da nitrogenase na folha +1 em duas variedades cultivadas em campo sem N, aos 100 dias após o plantio.

No primeiro período de crescimento avaliado (FV1) a AN foi maior para o capim colômbio e não apresentou diferença em relação a tiririca e a CSN. A CCN e o sorgo apresentaram as menores AN e diferenças entre si (Tabela 2). Na segunda fase de crescimento, a CSN e o capim colômbio permaneceram com as maiores AN, no entanto, não são observados diferenças significativas entre o colômbio e a CCN, tiririca e o sorgo (Tabela 2).

Em plantas de arroz, Ayuni et al. (2015) avaliou a influência de doses do fertilizante do tipo ureia em bactérias do gênero *Stenotrophomonas maltophilia*, sob a NA. Os autores verificaram que a AN foi reduzida com o aumento da dose de ureia e a aplicação de 300 mg L<sup>-1</sup> de ureia inibiu totalmente a AN, o que refletiu na redução da população total das bactérias inoculadas nas raízes.

Com relação a quantidade de N acumulada na parte aérea, não houve diferença entre as duas fases de crescimento nas culturas do capim colômbio e sorgo (Tabela 2). A cana-de-açúcar apresentou diferença entre as fases, em que a CCN incrementou em 118% o conteúdo de N, e em contrapartida, a CSN reduziu em 25% a QNT entre as fases (Tabela 2).

A adubação nitrogenada promove aumento da biomassa da parte aérea e com o desenvolvimento da cultura o N absorvido da adubação é metabolizado e diluído, no

entanto devido a maior quantidade matéria seca o acúmulo total do N aumenta (Oliveira et al., 2013). Em plantas que se desenvolvem sob estresse de N, a biomassa da parte aérea reduz com a morte das folhas e os teores do nutriente também são menores, o que levou a redução da quantidade de N acumulada na parte aérea.

Este resultado demonstra que o indicativo de alta FBN nas plantas CSN, em virtude, da maior diluição do isótopo  $^{15}\text{N}$  (Tabela 2), não foi suficiente para atender a demanda nitrogenada da planta, uma vez que as plantas adubadas com N acumularam 202% e 2569% a mais de N na parte aérea na FV1 e FV2, respectivamente.

A quantidade de N acumulada na parte aérea do sorgo e do capim colômbio não apresentou diferença nas duas fases de crescimento (Tabela 2). Além disso, a tiririca apresentou redução nos teores acumulados de N na parte aérea na FV2. Segundo Oliveira (2012) em estudo com sorgo cultivado no Neossolo quartzarênico, o baixo estoque de N em solos arenosos com baixo teor de matéria orgânica não atende a necessidade nutricional de N em plantas como o sorgo e capim colômbio que apresentam alta produção de biomassa, o que promoveria redução da matéria seca produzida e menor acúmulo do N na parte aérea.

O acúmulo de N na parte aérea da tiririca foi semelhante aos observados por Oliveira (2012) ao utilizar essa erva daninha como planta referência na estimativa da contribuição da FBN em cana-de-açúcar em diferentes solos no cultivo em campo. Como a tiririca apresenta baixa produção de biomassa, a dose equivalente a  $10 \text{ kg ha}^{-1}$  utilizada para o enriquecimento do solo, em adição a contribuição da FBN estimada em 38,7 e 34,8% nas fases FV1 e FV2 (Tabela 3), respectivamente atendeu a demanda de N da planta.

A abundância do  $^{15}\text{N}$  na cana-de-açúcar adubada com N não apresentou diferença entre as fases de crescimento e foi maior quando comparada com as plantas referências (Tabela 2), o que indica presença da FBN nessas plantas utilizadas como padrão nos estudos de FBN na cana-de-açúcar (Tabela 3). Assim, a contribuição do N derivado da fixação biológica e do solo foi quantificada nas plantas de capim colômbio, tiririca, sorgo e na CSN utilizando a CCN como planta padrão que não apresentou pequena contribuição da FBN quando comparada às demais (Tabela 3).

**Tabela 3** - Contribuição do N derivado do solo e da FBN nas plantas de capim colônião, tiririca e sorgo e para cana-de-açúcar sem N em diferentes fases de crescimento, quando utilizada a cana-de-açúcar adubada com N como referência.

Fator	Ndffix		QNdffix		Ndfsolo		QNdfsolo	
	%		mg planta <sup>-1</sup>		%		mg planta <sup>-1</sup>	
	FV1	FV2	FV1	FV2	FV1	FV2	FV1	FV2
Colônião	52,97 aA	51,30 aA	16,96 bB	24,68 aB	47,02 bD	58,69 aB	30,93 aB	35,12 aA
Tiririca	38,77 aB	34,85 aB	19,48 aA	64,31 bA	60,89 aC	64,43 aB	43,23 aA	18,46 bAB
Sorgo	9,10 aD	8,86 aC	1,64 aD	1,59 aD	90,89 aA	83,31 aA	14,26 aC	14,50 aAB
Cana (CSN)	18,44 bC	58,66 aA	10,36 aC	11,04 aC	78,79 aB	53,58 bB	8,55 aD	3,90 bB
	F		F		F		F	
Tratamento	1152,43*		736,35*		106,95*		252,90*	
Tempo	27,42*		5,38**		11,64*		1,30 <sup>ns</sup>	
Trat*Tempo	36,43*		28,95*		23,73*		33,60*	
AIC	-19,2		-50,0		-41,6		-4,8	
Modelo	AR (1)		TOEPH		ANTE (1)		UN	

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \* e \*\* significativo a 1, e 5 % de probabilidade. CSN: Cana-de-açúcar sem adubação nitrogenada; FV1: % Ndffix: Contribuição do N derivado da FBN; QNdffix: Quantidade de N derivado da FBN; % Ndfsolo: Contribuição do N derivado do solo; QNdfsolo: Quantidade de N derivado do solo. AIC: Critério de informação de Akaike - AR (1): Autoregressive First Order; TOEPH: Heterogeneous Toeplitz; ANTE (1): Ante-Dependence; UN: Unstructured.

A contribuição da FBN entre as fases de crescimento das plantas, apenas apresentou diferença para a CSN, sendo observado incremento na ordem de 40,22% (Tabela 3). Na FV1 a cultura do sorgo apresentou a menor contribuição da FBN e permaneceu com os menores valores na segunda fase de crescimento (Tabela 3). Na FV2 a cana-de-açúcar e o capim colônião apresentaram as maiores contribuições do N<sub>2</sub> fixado da atmosfera, com valores entre 58,66 e 51,30%, respectivamente (Tabela 3).

Mesmo com contribuição percentual significativa a quantidade de N total oriundo da FBN no capim colônião e na cana-de-açúcar foi baixa e inferior ao do solo (Tabela 3). Para todas as plantas a contribuição do solo foi maior para nutrição nitrogenada, com destaque para o sorgo que utilizou em média 90,89 e 83,31% do N oriundo do solo nas respectivas fases FV1 e FV2. Na FV1, as maiores contribuições do N a partir do solo foram observadas para o sorgo e para a CSN (78,79%). Na FV2 o sorgo teve destaque apresentando média significativas de 83,31%. Nesta fase, não houve diferença significativa para o colônião, a tiririca e a CSN (Tabela 3).

As plantas de capim colônião e tiririca demonstraram contribuições significativas da FBN em torno de 52 e 37 %, respectivamente (Tabela 3). Em contra partida, como o sorgo apresentou, nas duas fases de avaliação, a contribuição da FBN inferior a 10 % e maior participação do N do solo no total acumulado na parte aérea. Desse modo, essa espécie pode ser recomendada como planta referência em estudos que estimam a FBN

em gramíneas que fazem associação com bactérias diazotróficas fixadoras do N<sub>2</sub> atmosférico, quando utilizam o método da diluição isotópica do <sup>15</sup>N em condições de campo, em virtude da limitação de enriquecer grandes volumes de solo e manter o suprimento contínuo desse isótopo em maior quantidade durante todo o ciclo da cultura.

## **6. CONCLUSÕES**

- A cana-de-açúcar pode ser utilizada como cultura referência para estudos de abundância natural de N quando adubada com nitrogênio.
- Dentre os espécimes comumente utilizados como controle na técnica da abundância natural, o sorgo possui menor contribuição da FBN e menor diluição de <sup>15</sup>N podendo ser utilizado como referência em estudos de diluição isotópica.
- Não é indicada a utilização do capim colônio e tiririca para estudos de fixação biológica em cana-de-açúcar visto que há contribuição de N via FBN nessas plantas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transaction on Automatic Control**, AC-19, p.716-723, 1974.

ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; JANTALIA, C.P.; BODDEY, R.M. & URQUIAGA, S. Emprego de isótopos estáveis para o estudo do carbono e nitrogênio no sistema solo-planta. In: AQUINO, A.M. & ASSIS, R.L., orgs. **Processos biológicos no sistema solo-planta: Ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa/Informação Tecnológica, 2006. cap. 13, v. 1, p. 343-368.

ANDRADE NETO, R. C.; MIRANDA, N. O.; DUDA, G. P.; GÓES, G. B.; LIMA, A. S. Crescimento e produtividade do sorgo forrageiro BR 601 sob adubação verde. **Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 68, p. 7, 2010.

ARAÚJO, E. de O.; MARTINS, M. R.; VITORINO, A. C. T.; MERCANTE, F. M.; CABALLERO, S. S. U. Effect of nitrogen fertilization associated with diazotrophic bacteria inoculation on nitrogen use efficiency and its biological fixation by corn determined using <sup>15</sup>N. *African Journal of Microbiology Research*. v. 9, p. 643-650, 2015.

AYUNI, N.; RADZIAH, O.; NAHER, U. A. A.; PANHWAR, Q.A.; HALIMI, M. S. Effect of nitrogen on nitrogenase activity of diazotrophs and total bacterial population in rice soil. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1358–1364, 2015.

BALDANI, J.I.; TEIXEIRA, K.R.S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F.L.; HEMERLY, A.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; NOGUEIRA, E.M.; ARAÚJO, J.L.S.; BALDOTTO, L.E. B.; SOARES, L.H.B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V.L.D.; CARVALHO, T.L.G.; ALVES, B.J.R.; JAMES, E.K.; JANTALIA, C.P.; FERREIRA, P.C.G.; VIDAL, M.S.; BODDEY, R.M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família da Poaceae (antiga Gramineae). In: RIBEIRO, M.R.; NASCIMENTO, C.W.; RIBEIRO FILHO, M.R. & CANTALICE, J.R.B., (Ed.) **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2009, v.6, p.203-271.

BAPTISTA, R. B.; DE MORAIS, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Variations in the <sup>15</sup>N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N<sub>2</sub> fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 124–129, 2014.

BODDEY, L. H. et al. **A Avaliação da Fixação Biológica de N<sub>2</sub> Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática**. Seropédica – RJ: Embrapa Agrobiologia, 2007.

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

BOUYOUCOS, G. J. Estimation of the colloidal material in soils. **Science**, v. 64, p. 362, 1926.

BRITO, M. DE M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C. DA. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio, fertilizante nitrogenado e nitrogênio do solo no desenvolvimento de feijão e caupi. **Bragantia**, v. 70, n. 1, p. 206–215, 2011.

DOMMARGUES, Y.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, G.; PIERRETTE WEINHARD. Non-symbiotic nitrogen fixation in the rhizo-spheres of rice, maize and different tropical grasses. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 83–89, 1973.

DOS SANTOS, R. L. **Molibdênio no metabolismo e na fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar**. 2014. 135 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

DURIGAN, J. C.; CORREIA, N. M.; TIMOSSI, P. C. Estádios de desenvolvimento e vias de contato e absorção dos herbicidas na inviabilização de tubérculos de *Cyperus rotundus*. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 4, p. 621-626, 2005.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solos. 2 ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 212p.

GILLER, K.E.; WANI, S.P.; DAY, J.M. Use of isotope dilution to measure nitrogen fixation associated with the roots of sorghum and millet genotypes. **Plant and Soil**, v. 90, p. 255-263, 1986.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The Acetylene - Ethylene Assay for N<sub>2</sub> Fixation: Laboratory and Field Evaluation. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1185–1207, 1968.

HARDY, R.; BURNS, R.; HOLSTEN, R. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, p. 47-81, 1973.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

JOHNSTON-MONJE, D.; RAIZADA, M.N. Plant and Endophyte Relationships: Nutrient Management. **Comprehensive Biotechnology** (Second Edition). Canada, v.4, p. 713–727. 2011.

KIEHL, E. J. **Manual de Edafologia: relações solo-planta**. São Paulo: Ceres, 1979. 262 p.

KLUTE, E. D. **Methods of soil analysis, part 1- physical and mineralogical methods**. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, 2 ed., 1986. 1188 p.

KÖPPEN, W. Climatologia: com um estúdio de los climas de la tierra. Publications In: **Climatology**: Laboratory of Climatology, 1948. New Gersey. 104p.

LEAMER, R.W.; SHAW, B. A simple apparatus for measuring noncapillary porosity an extensive scale. **Journal of American Society of Agronomy**, Washington, v.33, p.1003-1008, 1941.

OLIVEIRA, C. A. de. **Estimativas da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por  $\delta^{15}\text{N}$** . 2012. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas. Brasil. 2012.

OLIVEIRA, E. C. A.; DE OLIVEIRA, R. I. DE.; DE ANDRADE, B. M. T.; FREIRE, F. J.; JÚNIOR, M. A. L.; MACHADO, P. R. Crescimento e acúmulo de matéria seca em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Engenharia Agrícola e Ambiental**, n. 19, p. 951–960, 2010.

OLIVEIRA, L. B. Determinação da macro e microporosidade pela “mesa de tensão” em amostras de solo com estrutura indeformada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 197-200, 1968.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Fundação IAC, 1996. p. 233-243.

RIDESIA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. Censo Varietal – Variedades RB, Participação, uso e manejo. Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil. 2015. Disponível em: <<http://www.stab.org.br>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

SCHULTZ, N.; DE MORAIS, R. F.; DA SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P., LEITE; J. M.; PEREIRA, W. CARNEIRO JÚNIOR, J. DE B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47 n. 2, p. 261–268, 2012.

SILVESTER, W. B.; BENNETT, K. J. Acetylene reduction by roots and associated soil of New Zealand conifers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 5, n. 1, p. 171–179, 1973.

SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. (Ed.). In: Embrapa Informação Tecnológica. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Brasília, Embrapa, 2004. 2 ed. p. 416.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 35–49, 2012.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; MORAIS, R.F. de; BATISTA, R.B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; SÁ, J. e M.; BARBOSA, K.P.; RESENDE, A.S. de; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data of the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5-21, 2011.

WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v. 63, p. 29-38, 1934.

---

**CAPÍTULO II**  
**ADUBAÇÃO MOLÍBDICA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE**  
**NITROGÊNIO EM CANA PLANTA**

---

## **CAPÍTULO 2:**

### **ADUBAÇÃO MOLÍBDICA NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CANA PLANTA**

#### **RESUMO**

O molibdênio (Mo) é um micronutriente aniônico exigido em pequenas quantidades pelas plantas, e que participa como constituinte de complexos enzimáticos como a redutase do nitrato, responsável pela assimilação do nitrato, e na nitrogenase, responsável pela contribuição do nitrogênio via fixação biológica de nitrogênio (FBN). Deste modo, o suprimento adequado do Mo proporciona incrementos na atividade dessas enzimas com efeitos significativos no crescimento e produtividade da cultura. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a contribuição da adubação molíbdica em interação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na fixação biológica do N<sub>2</sub> e no crescimento da parte aérea da cana planta. O estudo foi conduzido em casa de vegetação, em vasos com solo arenoso enriquecido com 2 % de átomos de <sup>15</sup>N. Os tratamentos foram constituídos de adubação nitrogenada, da adubação molíbdica, e da inoculação com bactérias diazotróficas. Os tratamentos foram distribuídos em blocos casualizados, utilizando delineamento experimental em esquema fatorial 2 x 2 x 3, com quatro repetições. As variáveis avaliadas foram crescimento, acúmulo de matéria seca e quantidade de N total na parte aérea das plantas, enzimas nitrogenase e redutase do nitrato, clorofila total e a contribuição da FBN utilizando como referência a abundância natural de <sup>15</sup>N da própria cana-de-açúcar com aplicação do adubo nitrogenado aos 50 e 100 dias após a germinação. O Mo apresentou incrementos na biomassa seca da parte aérea, na atividade da enzima nitrogenase e na FBN quando combinado a estirpe UAGC 869 promovendo incrementos na ordem de 80,2%, 25% e 42,74% sem a presença do adubo nitrogenado aos 100 dias após a germinação. Mesmo assim, a adubação molíbdica supriu 3% da demanda total de N da planta, estimadas em 86,08 g kg<sup>-1</sup>. O Mo atua sinergicamente com às bactérias diazotróficas no crescimento e desenvolvimento da planta, bem como na FBN em cana planta. Entretanto, os incrementos encontrados não são suficientes para suprir a necessidade total do N pela planta, mostrando a importância da adubação nitrogenada para a cana planta.

**Palavras-chaves:** Cana-de-açúcar, Molibdênio, Diluição isotópica, Nitrogenase.

## ABSTRACT

The Molybdenum (Mo) is an anionic micronutrient required in small amounts by plants, and he participating as a constituent of enzyme complexes such as nitrate reductase, responsible for the assimilation of nitrate, and nitrogenase, responsible for nitrogen contribution via biological nitrogen fixation (BNF). Thus, an adequate supply of Mo may increase a activity these enzymes having significant effects on growth and crop productivity. In this context, the aim of this study was to evaluate the contribution of molybdenum fertilization in interaction with diazotrophs and nitrogen fertilization on biological N<sub>2</sub> fixation and growth of the aerial part of the plant cane. The study was conducted in a greenhouse in pots with enriched sandy soil with 2% <sup>15</sup>N atoms. The treatments consisted of nitrogen fertilization, of molybdenum fertilization and inoculation with diazotrophs. The treatments were distributed in randomized blocks, using experimental design factorial 2 x 2 x 3, with four replications. The variables were growth, dry matter accumulation and amount of total N in the shoot, nitrogenase enzymes and nitrate reductase, chlorophyll and the contribution of BNF using as reference the natural <sup>15</sup>N abundance of own sugarcane with application of nitrogen fertilizer at 50 and 100 days after germination. The Mo showed increases in dry biomass of the aerial part, in nitrogenase enzyme activity and FBN when combined with UAGC 869 strain promoting increases in the order of 80,2%, 25% and 42,74% without the presence of nitrogen fertilizer to 100 days after germination. Even so, the Mo application provide back 3% of the total N demand of the plant, estimated at 86,08 g kg<sup>-1</sup>. The Mo operate synergistically with the nitrogen fixing bacteria in the growth and development of the plant, as well as in BNF in sugar cane plant. However, the increases found are not sufficient to meet the total requirement of N by the plant, showing the importance of nitrogen fertilizer to plant sugarcane.

**Key words:** Sugarcane, Molybdenum, Isotopic dilution, Nitrogenase.

## INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com destaque privilegiado na exportação de subprodutos da cultura com participação de 5,7 % das exportações brasileiras (CONAB, 2015). O país se destaca no consumo de fertilizantes nitrogenados, dentre os quais representaram 28 % de todo o produto utilizado na última safra entre as culturas agrícolas (SECEX, 2013; ANDA, 2015). Diante da importância no sistema produtivo, estudos de novas técnicas que ajudem a reduzir o consumo dos fertilizantes não renováveis, como os nitrogenados, são necessários na busca de uma agricultura mais sustentável.

Na cana-de-açúcar, o nitrogênio (N) é o nutriente absorvido em maiores quantidades (OLIVEIRA et al. 2016), sendo responsável por 91 % do crescimento da planta (VALE et al. 2011), no qual o fornecimento adequado do nutriente propicia a cultura elevada eficiência fotossintética, alta produtividade e vigoroso crescimento (GOLDEMBERG et al., 2008). Contudo, o baixo aproveitamento do nutriente aplicado via adubação é considerado o fator mais limitante à produtividade e longevidade dos canaviais brasileiros.

Segundo Franco et al. (2011) a contribuição do N proveniente do fertilizante em cana planta varia durante o ciclo da cultura, apresentando aproveitamento de 40 % do N total da planta nas fases iniciais de crescimento e redução durante o ciclo da cultura, obtendo aproveitamento na ordem de 10% do N na fase final vegetativa. Este resultado demonstra baixa contribuição do N-fertilizante para cana planta e evidencia que existe outras fontes para suprir parte do N exigido nesse ciclo de crescimento, estimada em até 260 kg ha<sup>-1</sup>, dependendo da variedade utilizada e manejo de cultivo adotado (OLIVEIRA et al. 2011; OLIVEIRA et al. 2016).

Entre as possíveis fontes alternativas de N, se destacam a mineralização da matéria orgânica do solo, com estimativas de contribuição na ordem de 16,67% por ano (OTTO et al., 2013) e a fixação biológica do N<sub>2</sub> atmosférico (FBN) por bactérias diazotróficas que podem se associar a cana-de-açúcar e disponibilizar até 30 % de todo N requerido pela planta (URQUIAGA et al. 2012).

O maior aproveitamento do N-fertilizante e a disponibilidade de fontes alternativas à adubação nitrogenada para a cana planta proporciona maior rentabilidade ao produtor, bem como torna o cultivo da cana-de-açúcar mais sustentável. Resultados encontrados por Oliveira (2012a) demonstraram que aplicação concomitante do molibdênio (Mo) e adubo nitrogenado no fundo do sulco de plantio conseguem suprir a

necessidade de doses mais elevadas do adubo nitrogenado com produtividade da cultura semelhantes. Este resultado demonstra o efeito positivo que o Mo possui sobre a assimilação do N absorvido e demonstra a necessidade de mais estudos sobre o assunto.

O Mo é um micronutriente mineral essencial ao metabolismo das plantas, que embora seja requerido em pequenas quantidades, suas funções constituem importante papel na assimilação do N pela planta. Participa como co-fator do complexo enzimático nitrogenase (AN) responsável pela quebra da ligação tríplice do N<sub>2</sub> e conversão a NH<sub>3</sub>. Este processo é realizado por bactérias associativas utilizando energia celular na forma de ATP (REIS E TEIXEIRA, 2005; SCHWARZ et al., 2009).

Esse micronutriente também participa do complexo enzimático redutase do nitrato (ARN) responsável pela redução de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no processo assimilativo do N do solo (TAIZ E ZEIGER, 2013). Em ambos os processos, a função do nutriente está ligada ao transporte de elétrons durante as reações bioquímicas e sua deficiência implica em menor atividade das enzimas com conseqüente redução do processo simbiótico e da assimilação de N (FERREIRA et al., 2003; MENGEL; KIRKBY, 2001).

A importância do Mo em elevar a atividade dessas enzimas está correlacionada ao melhor aproveitamento do N, como observado por Santos (2014) em estudo de campo com as variedades RB867515 e RB92579, que verificou na cana planta que a adição de 200 g ha<sup>-1</sup> de Mo, aumentou da atividade da ARN e estimulou a atividade da AN na folha +1 e nas raízes da cultura, bem como promoveu ganhos significativos na produtividade de colmos.

Nesta perspectiva, o Mo no solo, pode influenciar diretamente na assimilação metabólica e principalmente nos resultados de fixação biológica do N<sub>2</sub> por bactérias diazotróficas inoculadas na cana planta e cana soca, que tem apresentado pouca contribuição (SCHULTZ et al., 2014) na nutrição nitrogenada e não tem sido adotada, como prática, nos cultivos comerciais. A contribuição das bactérias diazotróficas inoculadas na cana-de-açúcar para a nutrição nitrogenada pode ser considerada baixa, quando comparadas com outras gramíneas, como o arroz, em que as bactérias disponibilizam em torno de 70% do N total requerido (SABINO, et. al, 2012).

Os solos brasileiros possuem deficiência natural do Mo devido às exportações oriundas das colheitas e a reposição insuficiente na prática da adubação molíbdica o que, aos poucos, esgotaram as reservas naturais do solo. Assim, estudos com adição desse micronutriente na prática da adubação pode ser uma alternativa de sucesso no aumento do potencial de fixação do N<sub>2</sub> atmosférico por bactérias diazotróficas, como já observado

em culturas das leguminosas como em soja (RECHIATU et al., 2015), ervilhaca (ALAM et al., 2015) e feijão (MARTINS et al., 2013'). Neste contexto a utilização do molibdênio promoverá um incremento na atividade da enzima nitrogenase e da atividade da enzima redutase do nitrato em cana-de-açúcar, o que incrementará a assimilação metabólica de N, a fixação biológica de nitrogênio e a quantidade de N total nas plantas inoculadas.

Neste sentido, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a contribuição da adubação molíbdica na produção de biomassa da parte aérea e na fixação biológica do N<sub>2</sub> atmosférico em cana planta inoculada com bactérias diazotróficas e adubadas com N.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **2. EXECUÇÃO DO EXPERIMENTO**

#### **2.1. Condução experimental**

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, situada na cidade do Recife, Estado de Pernambuco com coordenadas geográficas 8° 1' 0,4'' Sul e 34° 56' 41'' Oeste. O estudo foi conduzido no período de 31/07/2015 a 08/11/2015 o que totalizou 100 dias avaliação experimental.

O clima da região segundo a classificação de Koppen (1948) enquadra-se no macroclima Am -clima tropical chuvoso, no qual a temperatura média do mês mais frio é superior à 18° C e à do mês mais quente superior à 22°C. As chuvas são mais abundantes no inverno e escassas no verão com média anual de precipitação superior a 1.500 mm.

Os tratamentos foram constituídos a partir da interação entre a adubação nitrogenada, molíbdica e estirpes de bactérias, sendo identificados como: T1 - Tratamento Controle (-Inoc, - N e - Mo); T2 - Adubação Nitrogenada (Equivalente a 60 kg ha<sup>-1</sup> de N); T3 - Adubação Molíbdica (Equivalente a 1,5 g ha<sup>-1</sup> de Mo); T4 - Adubação Nitrogenada e Molíbdica; T5 - Apenas linhagem 1 (UAGC 865); T6 – Linhagem 1 + Adubação Nitrogenada; T7 - Linhagem 1 + Adubação Molíbdica; T8 - Linhagem 1 + Adubação Nitrogenada + Adubação Molíbdica; T9 – Apenas linhagem 2 (UAGC 869); T10 – Linhagem 2 + Adubação Nitrogenada; T11 – Linhagem 2 + Adubação Molíbdica; T12 – Linhagem 2 + Adubação Nitrogenada + Adubação Molíbdica.

Os tratamentos foram distribuídos em blocos ao acaso, sob delineamento estatístico em fatorial de 2 x 2 x 3 (Com e Sem nitrogênio x Com e Sem molibdênio x

Sem Linhagem; Linhagem 865 e Linhagem 869), com 4 repetições, totalizando 48 parcelas experimentais.

As parcelas experimentais consistiram em vasos de com capacidade de 50 L, que totalizou 0,050 m<sup>3</sup>, espaçados em 1,2 m. Na parte inferior central dos vasos, foram instalados drenos que apresentavam diâmetro de 2,5 cm<sup>2</sup>, com objetivo de não saturar o solo da parte inferior do vaso e reutilizar a solução nutritiva na irrigação posterior. Na base interna dos vasos, acima do dreno, foi utilizada uma tela de plástico perfurada e posteriormente foram adicionados 4 cm de brita cascalhinho (nº 12) e solo calculado para massa total do tonel de 74 kg.

Como substrato de crescimento, foi utilizado areia lavada, com textura muito arenosa, pobre em matéria orgânica e nutrientes, de modo que a fonte principal de N para a cana-de-açúcar fosse o adubo nitrogenado ou o N<sub>2</sub> atmosférico. A caracterização química e física do solo foi realizada em três amostras compostas oriundas de nove amostras simples coletadas aleatoriamente (Tabela 1).

Para caracterização química e física, as amostras de solo foram secas ao ar (Terra Fina Seca ao Ar - TFSA) e passadas em peneiras com malha de 2,0 mm. Para a análise de matéria orgânica, foi necessário realizar a maceração do material até passar em peneiras de 0,5 mm. Na análise química foi determinado o pH em água, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, H+Al, P, Fe, Cu, Zn, Mn e COT (carbono orgânico total).

O Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e o Al<sup>3+</sup> foram extraídos com KCl (1 mol L<sup>-1</sup>), no qual o Ca<sup>2+</sup> e o Mg<sup>2+</sup> foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o alumínio por titulometria. O K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, P, Fe, Cu, Zn e Mn foram extraídos via solução de Mehlich<sup>-1</sup>, no qual o K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> foram determinados por fotometria de chama, o P por espectrofotometria e os demais foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. A acidez potencial (H + Al) foi extraída em acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup> e dosada por titulometria.

Todos os procedimentos metodológicos descritos seguiram a metodologia descrita em EMBRAPA (1999), apenas o COT foi determinado por titulometria segundo o método de Walkley-Black Modificado (WALKLEY & BLACK, 1934; EMBRAPA, 1999). Com os resultados das análises químicas foram calculados a soma de bases (SB), CTC efetiva (t), CTC a pH 7,0 (T), saturação por alumínio (m), saturação por bases (V) e saturação por sódio (PST).

**Tabela 4** - Caracterização química e física do solo e do extrato da pasta saturada.

<b>Atributos químicos</b>		<b>Extrato da pasta saturada</b>	
pH (H <sub>2</sub> O)	5,48	pH (H <sub>2</sub> O)	7
Carbono orgânico (g kg <sup>-1</sup> )	1,78	C.E (dS m <sup>-1</sup> )	2,77
Fósforo (mg dm <sup>-3</sup> )	1,1	Cálcio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	33,85
Zinco (mg dm <sup>-3</sup> )	1,96	Magnésio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	1,77
Ferro (mg dm <sup>-3</sup> )	30,3	Sódio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	77,19
Manganês (mg dm <sup>-3</sup> )	1,56	Potássio (mmol <sub>c</sub> L <sup>-1</sup> )	13,83
Cobre (mg dm <sup>-3</sup> )	0,15	<b>RAS</b>	13,09
Cálcio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,006	<b>Atributos físicos</b>	
Magnésio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,008	Areia grossa (g kg <sup>-1</sup> )	826,4
Alumínio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,42	Areia fina (g kg <sup>-1</sup> )	138,4
Potássio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,382	Silte (g kg <sup>-1</sup> )	17,6
Sódio (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,138	Argila (g kg <sup>-1</sup> )	17,7
H + Al (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,052	Ds (g cm <sup>-3</sup> )	1,69
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,534	Dp (g cm <sup>-3</sup> )	2,66
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,954	PT (%)	51,13
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	3,586	Classe textural	Arenosa
m (%)	14,22	θ <sub>cc</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	0,12
V (%)	70,66	θ <sub>pmp</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	0,03
PST (%)	59,62		

SB: Soma de bases; t: CTC efetiva; T: CTC potencial; <sup>15</sup>N: Porcentagem de <sup>15</sup>N na folha +1; m: Saturação por alumínio; V: Saturação de bases; PST: Porcentagem de sódio total; C.E: Condutividade elétrica; RAS: Relação de adsorção de sódio; Ds: Densidade do solo; Dp: Densidade de partículas; PT: Porosidade total; θ<sub>cc</sub>: Umidade na capacidade de campo; θ<sub>pmp</sub>: Umidade no ponto de murcha.

Para as análises físicas, foram realizadas avaliações de granulometria, densidade de solo, densidade de partículas e porosidade total. Para a determinação da textura, a fração areia foi seca em estufa a 105 °C e separada via tamisação em peneiras 0,2 mm e 0,053 mm para obter as frações areia grossa e areia fina. A fração argila foi determinada pelo método do hidrômetro descrito por Bouyoucos (1926) e o silte obtido por diferença.

Na determinação da densidade do solo foi utilizado o método do anel volumétrico (EMBRAPA, 1997). A densidade de partículas foi determinada pelo método do balão volumétrico (KIEHL, 1979; EMBRAPA, 1997). Para a determinação da porosidade total do solo foi utilizado a Curva Característica de Retenção de Água no Solo (CCRAS).

## 2.2. Correção do solo

Após a caracterização química do solo, realizou-se a correção da acidez, utilizando calcário dolomítico (35,70% de CaO; 14,44% de MgO; 69,90% de PRNT) na dose equivalente a 4 Mg ha<sup>-1</sup>. A necessidade de calagem foi calculada conforme Sousa e Lobato (2004) pelo método da neutralização da acidez trocável e elevação dos teores de Ca e Mg trocáveis.

Em adição ao calcário, foi adicionado dose equivalente a 7,5 Mg ha<sup>-1</sup> de gesso mineral (26,60% de CaO e 2,49% de MgO; 7,02% de PRNT), com o propósito de reduzir a saturação de sódio do solo para 8,5%, conforme o método da porcentagem de sódio trocável. O calcário e gesso, foram incorporados de forma homogênea e toda a massa de solo foi envolta por lona e incubada durante 15 dias. Após esse período, o solo foi reavaliado, apresentando faixa de pH em água acima de 5,5.

Após a incubação do solo com os corretivos, foi realizada a extração da solução do solo ao vácuo e determinado os cátions em solução e da atividade do sódio após a gessagem (Tabela 1). Para caracterização da solução do solo foi determinado o pH em água no potenciômetro e a CE no condutivímetro. Os cátions de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica e o K<sup>+</sup> e Na<sup>+</sup> foram determinados por fotometria de chama. Com os resultados das análises foi calculada a Razão de Adsorção de Sódio na solução (RAS).

## 2.3. Enriquecimento do solo com <sup>15</sup>N

O solo foi enriquecido utilizando o fertilizante do tipo ureia com 2% de átomos de <sup>15</sup>N, produzido no Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/ USP. Para cada parcela experimental foi adicionado a quantidade correspondente a dose de 10 kg ha<sup>-1</sup> de N, considerando a massa de solo de 74 kg. Deste modo, foram aplicados 0,23 g de N por parcela, (0,49 g ureia com 2 % de átomos de <sup>15</sup>N por parcela).

Para facilitar a aplicação do fertilizante e a marcação do solo, a ureia foi diluída em água e formou-se uma solução de N-ureia com volume de 500 ml. O volume da solução foi calculado, conforme a capacidade de armazenamento da água no solo, de modo que não houvesse drenagem da solução após a aplicação e consequente perda do <sup>15</sup>N.

Para a aplicação da solução enriquecida com  $^{15}\text{N}$ -ureia foi retirado 75% do volume de solo separadamente em cada parcela experimental, e a solução previamente preparada foi aos poucos sendo homogeneizada ao solo até que toda a massa de solo ficasse umedecida. Essa operação visou reduzir as perdas de N por volatilização da amônia, bem como, marcar homogeneamente todo o solo com o adubo.

Após a aplicação da solução, todos os vasos foram cobertos com lona plástica escura e incubados durante 30 dias. Esse processo visou elevar a abundância  $^{15}\text{N}$  do solo, de modo que permanecesse superior quando comparado com da atmosfera (0,3663 %). Assim, todos os tratamentos receberam pequena quantidade de N, que não inibisse na associação das bactérias inoculadas com a cana-de-açúcar.

#### **2.4. Seleção e Inoculação das bactérias**

Para o tratamento inoculante, foram selecionadas as estirpes *Pantoea* sp. (UAGC 865) isolada da variedade de cana-de-açúcar RB92579 e a estirpe *Stenotrophomonas* sp. (UAGC 869) isolada da variedade de cana-de-açúcar RB867515, sendo essas estirpes escolhidas por apresentar indicação de FBN e maior produção biomassa da parte aérea entre as bactérias inoculadas na cana-de-açúcar e avaliadas por Lima (2012).

As estirpes selecionadas fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE) e foram isoladas das respectivas variedades quando apresentavam 04 meses de idade (LIMA, 2012).

As bactérias foram repicadas a partir de colônias isoladas em placas de petri e multiplicada em meio líquido de crescimento Tryptone Soya Agar (TSA) 10% pH 7,3 e agitada por 72 horas (ARAÚJO, et al., 2010). Em seguida as bactérias foram repicadas e diluídos na proporção de 1:50 (p/v) em água, resultando em uma solução bacteriana com concentração aproximada de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para cada estirpe (LIMA, 2012).

Na inoculação, foram utilizados colmos sementes da variedade RB867515 obtidos da Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina (EECAC/UFRPE), com 10 meses de crescimento. Os colmos sementes foram cortados de modo a permanecer com 0,20 cm e 01 gema viável que em seguida foram mergulhadas separadamente por 30 minutos em solução com densidade de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para cada estirpe em estudo e posteriormente

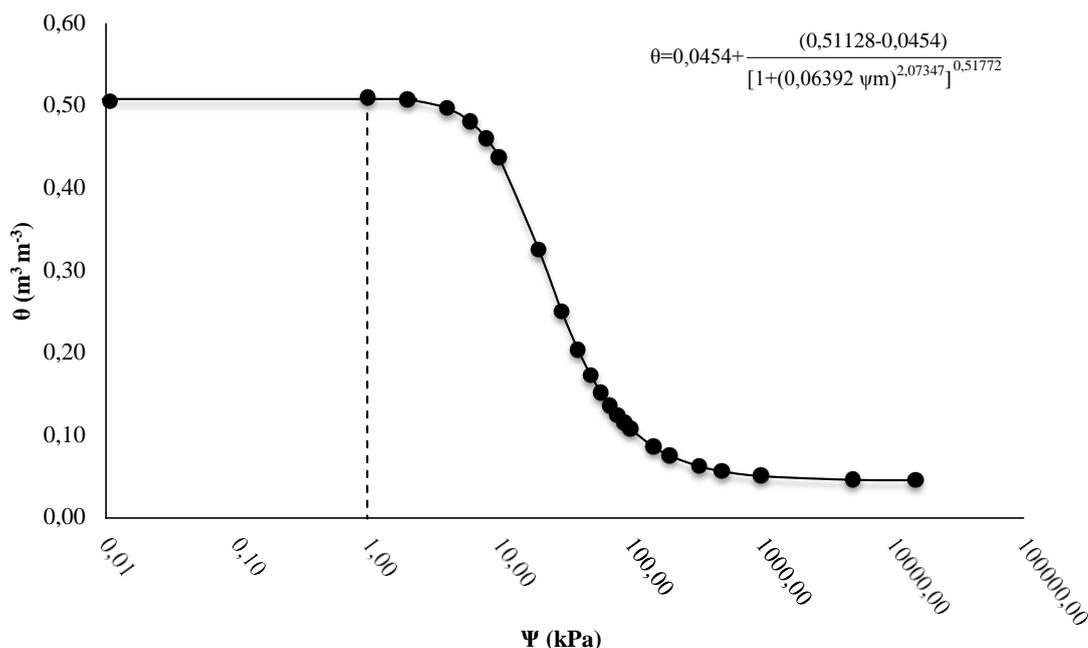
agitados a cada 10 minutos em recipiente com capacidade para 30 L, mantendo a temperatura da solução próxima dos 25 °C (LIMA, 2012).

A variedade de estudo escolhida foi a variedade RB867515, por ser a mais plantada nos canaviais brasileiros (RIDESA, 2015). Após a inoculação das bactérias, os colmos sementes inoculados e não inoculados foram plantados no período da manhã em horários semelhantes, sendo distribuídos quatro colmos por vaso, dispostos em dois sulcos com aproximadamente 0,2 m de profundidade e posteriormente cobertos com o solo do próprio vaso.

## **2.5. Controle da umidade e irrigação**

A umidade do solo foi mantida, por meio de regas diárias aplicadas uma única vez no período correspondente do plantio até os 60 dias após a germinação (DAG). Após esse período, a manutenção da umidade do solo foi realizada com duas regas diárias, no início da manhã e no final da tarde, de modo que o solo permanecesse com umidade durante o dia e a noite. Quando ocorria drenagem da solução do solo, o volume drenando foi adicionado a irrigação posterior.

Para calcular o volume da solução de irrigação, foram instalados em cada vaso tensiômetros na profundidade de 30 cm, e que com auxílio do tensímetro digital e da curva característica de retenção de água no solo (CCRAS) foi calculada a quantidade de água na irrigação (Figura 1). O valor de tensão obtidos foi transformado em volume de água necessários para reposição da umidade próxima à 80 % capacidade máxima de adsorção de água do solo. Para determinara a CCRAS foi utilizado procedimentos descritos por Leamer e Shaw, (1941) e Oliveira, (1968) para as tensões de tensões de 0, 10, 30, 60, 80 e 100 centímetros de coluna de água (cca) e por Klute (1986) para as tensões 333, 500, 1000, 5000 e 15000 cca.



**Figura 1** - Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ). Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten.

## 2.6. Adubação

Para o manejo nutricional das plantas, foram produzidas três soluções nutritivas. A primeira solução foi constituída apenas de N, utilizando como fonte a ureia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) enriquecida com 2 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ . A segunda solução foi constituída apenas de Mo, sendo utilizado como fonte o ácido molíbdico ( $\text{H}_2\text{MoO}_4$ ) e a terceira solução foi formulada com base na solução de Arnon & Hoagland (1950) e continha os demais macronutrientes e micronutrientes.

A composição química dos nutrientes presentes na solução indicada por Arnon & Hoagland (1950) e utilizada no experimento foram para os macronutrientes de 31 g  $\text{L}^{-1}$  para o fósforo, 234,6 g  $\text{L}^{-1}$  para o potássio, 200,6 g  $\text{L}^{-1}$  para o cálcio, 48,6 g  $\text{L}^{-1}$  para o magnésio, 64,2 g  $\text{L}^{-1}$  para o enxofre e para os micronutrientes 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o boro, 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o cobre, 648  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o cloro, 5022  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o ferro, 502  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o manganês, 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o zinco.

Os tratamentos com N foram adubados com 2,90 g vaso $^{-1}$  de ureia ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) com 2 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ , durante todo o ciclo de crescimento da planta, sendo esta quantidade equivalente a dose de 60 kg  $\text{ha}^{-1}$  e escolhida a partir da recomendação de Oliveira (2012) para estudos de interação do N com Mo. Para os tratamentos que

receberam o Mo, foram aplicados 0,90 g vaso<sup>-1</sup> durante o período de crescimento avaliado, que correspondeu a dose de 1,5 kg ha<sup>-1</sup>. A quantidade de Mo utilizada foi quantificada a partir de um ensaio experimental prévio, que utilizou concentrações crescentes de Mo na solução de irrigação, tendo como referência inicial o valor estabelecido na solução de Arnon & Hoagland (1950), ao qual foi escolhida a dose que não exibia os sintomas de deficiência desse nutriente nas plantas.

A primeira aplicação da solução nutritiva foi realizada aos 12 DAG, quando mais de 50% das plantas haviam germinado. Foram aplicados 250 mL de cada solução duas vezes por semana, com intervalos de três dias até o final do ciclo. Para que todas as plantas tivessem a mesma quantidade de solução aplicada, foi adicionada uma quantidade de água para completar a diferença para o volume de 2L. A aplicação foi realizada com regadores de capacidade de 1L na superfície do solo.

O pH e a condutividade elétrica (CE) das soluções foram monitoradas antes de cada aplicação, de modo que permanecessem respectivamente acima de 5,5 e abaixo de 2,0 dS m<sup>-1</sup>. Durante a realização do ensaio experimental, os valores de pH (6,2 a 6,8) e CE (1,2 a 1,9 dS m<sup>-1</sup>) das soluções nutritivas foram permaneceram abaixo do limite máximo permitido, não necessitando ajuste.

## **2.7. Avaliações biométricas**

Durante o período experimental foram realizadas duas avaliações biométricas aos 50 e 100 dias após a germinação (DAG), sendo avaliado a altura da planta e o diâmetro de colmos, bem como foi quantificado o número de folhas e a biomassa seca da parte aérea por planta.

Para a altura das plantas, foi mensurado, com auxílio de uma trena graduada, o comprimento a partir da base da planta rente ao solo até a extremidade da folha mais alta que apresentava o colarinho visível (folha +1) (NOBILE et al., 2011). O diâmetro do colmo, foi determinado na altura de 20 cm do solo utilizando um paquímetro digital. Para o número de folhas, foram contadas as folhas verdes e secas que permaneciam presas a planta.

Após as avaliações não destrutivas, as plantas foram cortadas rente ao solo e em seguida, pesadas para obtenção da massa úmida. Posteriormente foram levadas à estufa de circulação forçada de ar (60 °C) até atingir peso constante. Quando secas, as amostras foram pesadas para a obtenção da biomassa seca da parte aérea em g planta<sup>-1</sup>.

### 3. ANÁLISES LABORATORIAIS

#### 3.1. Avaliação da nitrogenase

Nas plantas em que foram realizadas as avaliações biométricas, foi determinada aos 50 e 100 DAG, a atividade da enzima nitrogenase na folha diagnóstica (folha +1), identificada como a folha mais jovem que apresenta o colarinho e a lígula visível (RAIJ et al., 1996), conforme metodologia proposta por Hardy et al. (1968).

Para determinar a atividade da enzima nitrogenase coletou-se a folha +1 de uma planta por parcela e posteriormente toda a amostra vegetal da folha foi acondicionada em frascos de vidro de 750 mL hermeticamente fechados contendo um anel de vedação de borracha no centro. Com auxílio de uma seringa volumétrica de 100 ml, foram retirados 90 ml do ar contido no frasco, e em seguida, foram adicionados 90 ml do gás acetileno (99,8% de C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>), que permaneceu no frasco durante uma hora, para que houvesse a redução acetileno e a produção do etileno.

Após o tempo decorrido, foram retirados, com o uso de outra seringa volumétrica menor, 9 ml da atmosfera dos frascos e armazenados em tubos “vacutainer” de 9 ml. Para obtenção da massa seca da folha utilizada na análise, o tecido vegetal foi levado à estufa de circulação forçada de ar (60 °C) até atingir peso constante. Quando secas as amostras foram pesadas em balança analítica.

A produção de etileno foi determinada por cromatografia gasosa, utilizando o cromatógrafo acoplado a coluna PORAPAK N empacotada e com temperaturas de forno, injetor e detector de ionização de chama, respectivamente, aos 70, 130 e 150 °C. As vazões de N<sub>2</sub> (gás de arraste), H<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> apresentavam-se em 30, 30 e 300 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Assim, atividade da enzima nitrogenase foi calculada pela equação 1 (BODDEY et al., 2007):

$$AN = \frac{(E_1 - E_2) \times V \times K_e}{244,50 \times S_e \times t \times m} \quad [E1]$$

Nesta equação, AN representa a atividade da nitrogenase em mmol de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>; E<sub>1</sub> é a área do pico de etileno na amostra inicial; E<sub>2</sub> é a área do pico do etileno na amostra

final; o V o volume do frasco em mL; o Ke representa a concentração do pico de etileno padrão em mg L<sup>-1</sup>; Se é a área do pico de etileno padrão; o "t" é o tempo de incubação em horas e "m" a massa do tecido vegetal em g.

### 3.2. Estimativa da fixação biológica do N<sub>2</sub>

Para a quantificação da abundância de átomos de <sup>15</sup>N da folha +1 foram utilizadas as amostras nas quais foram realizadas a determinação da AN. Assim, as amostras de folha após secas em estufa de circulação forçada de ar à 60 °C até peso constante, foram moídas em moinho tipo bolas TE-350 TECNAL até se apresentarem na forma de pó fino e passadas em peneira com malha de 0,595 mm (30 mesh). A abundância de átomos de <sup>15</sup>N foram determinados em espectrômetro de massa acoplado com analisador de N, modelo ANCA-GSL do fabricante SERCON Co, UK, do Laboratório de Isótopo Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP.

Para a determinação do N total da parte aérea (NT), as amostras de planta após secas em estufa foram moídas em moinho de facas TE-650 TECNAL. Após, foi procedida a digestão do material utilizando o método proposto pela EMBRAPA (2009) com adaptações. Dessa forma, foi pesada 100 mg de amostra de planta e foi transferida para um tubo digestor. Foi adicionado 1g da mistura de sais e 3 ml de ácido sulfúrico H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> p.a. (98%) e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> p.a. (30%). Após, a mistura foi colocada no bloco digestor e aquecida lentamente até os 350 °C até o obter um líquido viscoso esverdeado translúcido.

Para a destilação do material, o tubo digestor foi conectado ao destilador de arraste de vapores (método Kjeldahl) e foi precedida a destilação em 25 ml da solução de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> até completar 45 ml de solução. O material foi titulado com solução de HCl (0,01 mol L<sup>-1</sup>). Para o cálculo do N total do material, foi utilizada a seguinte equação:

$$N-NH_4 (g kg^{-1}) = (Vb - Va) \times 1,4 \quad [E2]$$

No qual, Vb é o volume de HCl gasto no teste branco (mL) e o Va é o volume de HCl gasto na amostra (mL)

Para o cálculo do percentual do nitrogênio derivado da fixação (% Ndffix), foi utilizada a relação entre a abundância do átomo de <sup>15</sup>N nos tratamentos e os valores de <sup>15</sup>N encontrados na planta referência (Equação 2). Para o presente estudo, a cana-de-

açúcar adubada com N foi considerada a planta controle mais adequada em virtude de sua menor diluição isotópica, ou seja, a porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  foi semelhante a marcação do solo, estimada em 2 % (Tabela 7).

$$\% \text{Ndffix} = \left[ 1 - \frac{(\% \text{A}^{15}\text{N}_{\text{excesso}})_{\text{Can.Inoc}}}{(\% \text{A}^{15}\text{N}_{\text{excesso}})_{\text{Refer}}} \right] \times 100 \quad [\text{E3}]$$

Na equação 3, a %Ndffix é a porcentagem do N derivado da fixação; o %A $^{15}\text{N}_{\text{Can.Inoc}}$  é a abundância de  $^{15}\text{N}$  na cana em estudo, inoculada e/ou adubada com Mo e o %A $^{15}\text{N}_{\text{Refer}}$  é a abundância de  $^{15}\text{N}$  na planta controle.

Para calcular a quantidade de N derivado fixação (QNdffix) em mg planta $^{-1}$ , foi utilizado o produto dos teores de NT das plantas (%) e da biomassa seca da parte aérea (BSPA) de cada planta avaliada (mg planta $^{-1}$ ) (Equação 4). Assim, posteriormente pode ser calculada a QNdffix a partir do produto da %Ndffix e QNT das plantas em estudo (Equação 5).

$$\text{QNT} = \frac{\text{NT} \times \text{BSPA}}{100} \quad [\text{E4}]$$

$$\text{QNdffix} = \frac{\% \text{Ndffix} \times \text{QNT}}{100} \quad [\text{E5}]$$

Como a cana-de-açúcar controle, inoculada e/ou adubada com Mo podem obter N do solo e da atmosfera, assume-se que o N total da planta será a soma do percentual do N derivado do solo e da fixação biológica do  $\text{N}_2$  atmosférico. Dessa forma, foi possível obter o percentual do N derivado do solo (%Ndfsolo) a partir do cálculo da diferença entre 100 % e a %Ndffix (Equação 6).

$$\% \text{Ndfsolo} = 100 - \% \text{Ndffix} \quad [\text{E6}]$$

Para cálculo da quantidade de N derivado do solo (QNdfsolo) em mg planta $^{-1}$ , foi utilizada a equação 7, no qual a variável QNdsolo foi obtida a partir do produto da %Ndfsolo e QNT das plantas (Equação 7).

$$QNdf_{\text{solo}} = \frac{\%Ndf_{\text{solo}} \times QNT}{100} \quad [E7]$$

### 3.3. Atividade da Enzima Redutase do nitrato

A atividade da RN foi determinada aos 50 e 100 DAG e seguiu a metodologia de Jaworski (1971) com modificações proposta por Santos et al. (2014), em que 10 discos foliares com 1 cm de diâmetro, foram coletados no terço médio, excluindo a nervura central, da Folha +2 no horário das 13h (Entre 12-14h). Os discos foram obtidos com auxílio do furador de folhas e posteriormente acondicionados em recipientes plástico de cor preta de 20 ml.

As amostras foram mantidas no gelo em caixa de isopor até o término da coleta e levadas imediatamente para o laboratório. Nos recipientes foram adicionados o meio de incubação composto por 2,5 mL de  $KNO_3$  300 mmol  $L^{-1}$ ; 2,5 mL de Tampão fosfato 285 mmol  $L^{-1}$  com pH 7,3; 1,0 mL de Tween 20 a 0,6% (v/v) e 4,0 mL de água deionizada totalizando 10 mL de extrato.

As amostras descansaram durante 90 min, a 32°C, no escuro e posteriormente foram retiradas alíquotas de 0,5 mL do meio que foram transferidas para um recipiente plástico de 50 ml. Foi acrescentado ao meio 0,5 mL de solução de sulfanilamida (1%) diluída em HCl 3 mols  $L^{-1}$  e 0,5 mL de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (0,02%). Realizou-se a homogeneização da mistura e foi incubada durante 20 min. Em seguida o volume foi completado para 4 mL com água deionizada.

A determinação foi realizada em espectrofotômetro ajustado para 540 nm com curva padrão. A atividade da RN foi estimada em  $\mu\text{mol}$  de nitrito liberado por g de tecido fresco por hora de incubação ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{NO}_2^-$ ) e calculada com base em equação linear obtida a partir do preparo prévio de curva-padrão.

### 3.4. Clorofila Total

Os teores dos pigmentos de clorofila total foram avaliados no mesmo período realizado para determinação da abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  e teor total de N, sendo utilizado a metodologia proposta por Lichtenthaler & Buschmann (2001). Para determinar a clorofila total coletou-se o terço médio, excluindo a nervura central, da folha

+3, no horário entre 07:00 e 10:00 horas. As amostras das folhas foram colocadas em folhas de papel alumínio (lado fosco), inseridas em caixa de isopor com gelo e levadas para o laboratório.

No laboratório, as amostras foram cortadas em pequenos tamanhos com aproximadamente 1 mm e pesou-se 0,1 g da matéria fresca cortada em recipientes de plástico de cor preta (para evitar o contato com a luz), sendo posteriormente adicionados 10 ml de acetona a 80% para incubação mantida sob refrigeração por 24 horas. A clorofila total foi determinada na solução incubada por meio de leituras em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 663 nm e 647 nm para clorofila a e b, respectivamente. Os teores dos pigmentos foram calculados utilizando a equação 8, proposta por Lichtenthaler & Buschmann (2001).

$$CT = (7,15 \times A_{663}) + (18,71 \times A_{647}) \quad [E8]$$

Nesta equação, o CT é a clorofila total em  $\mu\text{g.gMF}$  e A é a absorbância obtida no espectrofotômetro para os respectivos comprimentos de onda.

### **3.5. Análises estatísticas**

Os resultados foram analisados quanto aos critérios de distribuição normal e homocedasticidade dos dados e quando necessário foi realizada a transformação. Posteriormente os dados que apresentaram distribuição normal e homocedásticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em fatorial triplo 2 x 2 x 3. O efeito isolado ou da interação entre a adubação nitrogenada, adubação molíbdica e inoculação com bactérias, quando significativos, tiveram as médias comparadas entre si e com o tratamento controle pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o software SAS version student 2.0 (1991).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1. Crescimento da planta**

A aplicação do Mo promoveu efeito significativo no crescimento da cana planta aos 50 DAG. Entretanto, apenas o NF e a BSPA aumentou com a adubação molíbdica,

quando combinada ao N, com ganhos na ordem de 17,4 e 76,6 %, respectivamente (Tabela 2). No entanto, aos 100 DAG a adubação molíbdica não apresentou efeitos significativos no crescimento das plantas adubadas com a aplicação de N (Tabela 3).

Este resultado demonstra a importância da adubação nitrogenada nas fases iniciais de crescimento da cultura, visto que no início do cultivo, o solo não possuía N suficiente para suprir as necessidades da planta e o Mo atuou na metabolização do N absorvido suprimindo a carência do nutriente. Este resultado corrobora com Santos (2014) que estudando a aplicação de Mo na variedade RB867515, cultivada em condições de campo, não observou ganhos de BSPA pela adubação molíbdica sem e com adubação nitrogenada aos 70 dias após o plantio. Do mesmo modo, Santos et al. (2010) avaliando o efeito da época de aplicação de N com e sem adubação com 90 g ha<sup>-1</sup> de molibdênio, não verificaram efeitos significativos na BSPA do milho.

Não foi observado efeito das bactérias inoculadas na cultura neste período. Nas plantas inoculadas e não inoculadas com as bactérias diazotróficas, aos 100 DAG não foi observado efeitos positivos do Mo no crescimento e produção de biomassa da RB867515 (Tabelas 4). Também não foi observado efeito das bactérias nas plantas que não receberam a adubação molíbdica.

A inoculação isolada pode ter favorecido a colonização dos tecidos da cana pela “estirpe” testada, suprimindo o crescimento das populações bacterianas presentes no tecido vegetal, como indicado no resultado obtido pela enzima nitrogenase que foi menor quando as plantas foram inoculadas com as estirpes estudadas (Tabela 5). Segundo Oliveira et al. (2009) estirpes mistas em cana-de-açúcar são mais eficientes em promover a FBN devido a interações específicas do conjunto de inóculos com a variedade utilizada, o que pode não ser tão expressado quando realizadas infecções isoladas.

Apesar da ausência no efeito significativo da interação do Mo com a adubação nitrogenada e com as estirpes de bactérias testadas para BSPA aos 100 DAG, verificou-se principalmente para estirpe UAGC 869 que a adubação molíbdica promoveu incrementos de 80,2 e 63,6 % na massa seca produzida, respectivamente nas plantas não adubadas e adubadas com N (Tabela 4). De modo semelhante, também se constatou ganhos de 22,4 e 12,6 % com a utilização do Mo nas mesmas condições de oferta de N, respectivamente.

Provavelmente, este resultado pode ter ocorrido devido a bactéria ter sido isolada da variedade RB867515, o que demonstra uma melhor interação entre estirpe e variedade. Boddey et al. (2003), relata que a interação e eficiência da relação bactéria-planta são

dependentes do genótipo da planta. Lima (2012) observou que as reinoculação dos estipes bacterianos causaram maior promoção de crescimento quando oriundas de plantas de mesma variedade, fato que a autora relata ter sido ocasionado devido à especificidade dos isolados bacterianos à planta hospedeira. Este resultado também corrobora com os dados de AN encontrados na Tabela 5 em que a enzima na presença do Mo foi elevada em 37% sua atividade.

Aos 100 DAG, com a adição de N, os valores médios de BSPA foram superiores. Quando inoculada a estirpe UACG 869 em interação a adubação molíbdica, a adição de nitrogênio incrementou oito vezes a BSPA, corroborando com os resultados de Santos (2014) que observou para a variedade RB867515 valores médios mais elevados de BSPA com a aplicação do fertilizante nitrogenado, assim como observado neste estudo. Neste mesmo sentido, Vale et al., (2011) avaliando o crescimento e produção de matéria seca a partir da omissão de macronutrientes em cana planta com experimento de casa-de-vegetação observou que o N foi o nutriente mais limitante ao crescimento das plantas de cana-de-açúcar, reduzindo em 92% a BSPA das plantas.

A importância da adubação nitrogenada para a variedade RB867515 no ciclo de cana planta, pode ser constatada ao avaliar os efeitos isolado do N e observar incrementos significativos em todas as variáveis analisadas, tanto na fase inicial de crescimento, aos 50 DAG, como na fase de maior desenvolvimento da planta, aos 100 DAG (OLIVEIRA et al., 2010) (Tabelas 2, 3 e 4). As variedades de cana-de-açúcar mais recentes, como a RB867515, são mais produtivas (OLIVEIRA et al., 2011), mais exigentes em N (OLIVEIRA et al., 2016) e respondem linearmente a adubação nitrogenada no ciclo de cana planta (OLIVEIRA 2012a).

Quando a linhagem UACG 869 está associada a adubação nitrogenada aos 50 DAG houve redução nos valores médios de ALT, ao comparar com o tratamento não inoculado (Tabela 2). Há diversas evidências que a interação entre cana-de-açúcar e bactérias diazotróficas são benéficas ao desenvolvimento e produtividade das plantas. Por outro lado, a aplicação de N na forma de fertilizante pode limitar o processo simbiótico de alguns tipos de bactérias no início do desenvolvimento da cultura, visto que ainda não há associação bem estabelecida e a planta pode responder mais ao estímulo de absorção do nutriente o que reduz os benefícios do processo simbiótico. Carvalho, et al., (2011) observou que vários genes da cana são expressos com a associação dos endófitos. Contudo, a regulação dos genes envolvidos como o reconhecimento planta ao microrganismo, a defesa, a sinalização hormonal, o crescimento das plantas e

metabolismo do nitrogênio foram diferencialmente expressos durante as fases iniciais da associação.

**Tabela 2** - Avaliação biométrica na a variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 50 DAG com e sem a aplicação do Mo e N e inoculação com bactérias diazotróficas.

Fator	NF Folhas planta <sup>-1</sup>			BSPA g planta <sup>-1</sup>			DC mm			ALT m		
	Mo (g vaso <sup>-1</sup> )			Mo (g vaso <sup>-1</sup> )			Mo (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )		
<b>Bactéria</b>	0	0,9	<b>Média</b>	0	0,9	<b>Média</b>	0	0,9	<b>Média</b>	0	2,90	<b>Média</b>
Sem	7,50	7,75	7,63	14,90 aA	17,81 aA	16,355	13,02 bA	17,09 aA	15,06	1,60 aA	1,88 aA	1,74
UAGC 865	7,25	8,00	7,63	13,62 aA	15,45 aB	14,535	12,96 aA	13,24 aAB	13,1	1,60 aA	1,88 aA	1,74
UAGC 869	7,12	7,63	7,38	15,91 aA	10,97 aB	13,44	13,64 aA	13,00 aB	13,32	1,68 aA	1,48 aB	1,58
<b>Média</b>	7,29	7,79		14,81	14,74		13,21	14,58		1,63	1,75	
<b>N (g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0	7,33 aA	7,17 aB	7,25	13,52 aA	10,66 aB	12,09	11,78	11,67	11,73	-	-	-
2,90	7,25 bA	8,42 aA	7,84	16,10 aA	18,83 aA	17,47	14,64	17,22	15,93	-	-	-
<b>Média</b>	7,29	7,80		14,81	14,75		13,21	14,45		-	-	
<b>N (g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0		7,25			12,09			11,72 B			1,61	
2,90		7,83			17,46			15,92 A			1,75	
<b>Média</b>		7,54			14,78			13,82			1,68	
		F			F			F			F	
N		6,07*			24,08*			26,05*			5,02**	
Mo		4,88**			0,00 <sup>ns</sup>			2,25 <sup>ns</sup>			2,56 <sup>ns</sup>	
Bactéria		0,32 <sup>ns</sup>			2,55 <sup>ns</sup>			2,27 <sup>ns</sup>			1,97 <sup>ns</sup>	
Mo*Bac		0,47 <sup>ns</sup>			4,96**			3,10***			0,66 <sup>ns</sup>	
N*Bac		0,09 <sup>ns</sup>			0,70 <sup>ns</sup>			1,54 <sup>ns</sup>			5,17*	
N*Mo		9,87*			6,49**			2,66 <sup>ns</sup>			0,66 <sup>ns</sup>	
N*Mo*Bac		0,47 <sup>ns</sup>			2,41 <sup>ns</sup>			1,73 <sup>ns</sup>			0,77 <sup>ns</sup>	
CV (%)		11,59			18,9			15,67			12,66	

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \*, \*\* e \*\*\* significativo a 1%, 5% e 10% respectivamente. NF: Número de folhas; BSPA: Biomassa Seca da Parte Aérea; DC: Diâmetro de Colmo; ALT: Altura.

**Tabela 3** - Avaliação biométrica na a variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 100 DAG sem e com o Mo e N e inoculação com bactérias diazotróficas.

Fator	NF Folhas planta <sup>-1</sup>				DC mm				ALT m			
	Sem	Bactéria		Média	Sem	Bactéria		Média	Sem	Bactéria		Média
N (g vaso <sup>-1</sup> )		UAGC 865	UAGC 869			UAGC	UAGC 869			UAGC	UAGC 869	
0	9,00	10,13	9,75	9,63	13,02	15,68 aB	15,91 aB	14,87	1,26	1,42	1,40	1,36
2,90	12,42	12,88	13,00	12,77	31,08	28,27 aA	30,22 aA	29,86	2,57	2,57	2,66	2,60
<b>Média</b>	10,71	11,51	11,38		22,05	21,98	23,07		1,92	2,00	2,03	
<b>Mo(g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0	9,92	10,50	11,00	10,47	22,29	20,75	21,07	21,37	1,84	1,99	1,92	1,92
0,90	11,50	12,50	11,75	11,92	21,80	23,21	24,06	23,02	1,99	1,99	2,14	2,04
<b>Média</b>	10,71	11,50	11,38		22,05	21,98	22,57		1,92	1,99	2,03	
<b>N (g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0		9,63 B				14,87				1,36 B		
2,90		12,76 A				29,85				2,60 A		
<b>Média</b>		11,20				22,36				1,98		
<b>Mo(g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0		10,47 B				21,71				1,92 B		
0,90		11,92 A				23,02				2,04 A		
<b>Média</b>		11,20				22,37				1,98		
		F				F				F		
N		59,53*				376,88*				328,29*		
Mo		12,61*				2,91 <sup>ns</sup>				3,43***		
Bactéria		1,45 <sup>ns</sup>				0,81 <sup>ns</sup>				0,98 <sup>ns</sup>		
Mo*Bac		0,82 <sup>ns</sup>				1,44 <sup>ns</sup>				0,83 <sup>ns</sup>		
N*Bac		0,25 <sup>ns</sup>				4,47**				0,53 <sup>ns</sup>		
N*Mo		0,04 <sup>ns</sup>				2,26 <sup>ns</sup>				0,92 <sup>ns</sup>		
N*Mo*Bac		0,66 <sup>ns</sup>				0,14 <sup>ns</sup>				0,30 <sup>ns</sup>		
CV (%)		11,43				10,39				10,5		

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \*, \*\* e \*\*\* significativo a 1%, 5% e 10% respectivamente. NF: Número de folhas; DC: Diâmetro de Colmo; ALT: Altura.

**Tabela 4** - Biomassa seca da parte aérea (BSPA) para cana-de-açúcar com 100 DAG sem e com Mo, sem e com N e inoculação com bactérias diazotróficas.

Fator	Mo (g vaso <sup>-1</sup> )	BSPA		
		g planta <sup>-1</sup>		Média
Bactéria		0	N (g vaso <sup>-1</sup> )	
Sem	0	14,13 bA	2,90	55,93
	0,90	12,49 bA	97,73 aAB	44,63
UAGC 865	0	13,02 bA	76,76 aAB	43,16
	0,90	14,69 bA	73,29 aB	41,93
UAGC 869	0	10,52 bA	69,17 aB	51,19
	0,90	18,96 bA	91,86 aAB	84,63
Média	0	12,56	150,30 aA	
	0,90	15,38	87,63	
		F		
N			337,79*	
Mo			2,62 <sup>ns</sup>	
Bactéria			11,96*	
Mo*Bac			9,16*	
N*Bac			11,04*	
N*Mo			0,93 <sup>ns</sup>	
N*Mo*Bac			5,62*	
CV (%)			19,71	

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey;

<sup>ns</sup>não significativo, \*, \*\* e \*\*\* significativo a 1%, 5% e 10% respectivamente. BSPA: Biomassa Seca da Parte Aérea.

## 4.2. Enzimas Redutase do Nitrato e Nitrogenase e Clorofila Total

A adubação molíbdica associada as bactérias, apenas apresentou efeito significativo positivo na atividade da ARN na presença do N aos 50 DAG, sendo observado para bactéria UAGC869 aumento de 1,2  $\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gMF}$  com adição do Mo. Na bactéria UAGC865 a adubação molíbdica não apresentou diferença nas plantas adubadas com N e reduziu, em 1,4  $\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gMF}$  a ARN nas plantas em que o N não foi aplicado (Tabela 5).

Esse resultado pode ter acontecido devido a maior contribuição de  $\text{NH}_3$  via associação simbiótica na planta com a inoculação da UAGC 869 que promoveu menor absorção adubo do solo. Dessa forma, o amônio permaneceu por mais tempo acumulado no solo e passou pelo processo de nitrificação, aumentando a atividade da enzima nesse tratamento. Este resultado concorda com os dados de AN observados que apresentam atividade para a enzima mais elevados para a estirpe UACG 869 que para a UACG 865 (Tabela 5).

Na adubação convencional, em que os fertilizantes são aplicados em dose única ou parcelado em duas aplicações no solo, a nitrificação do  $\text{NH}_4^+$  é aumentada no decorrer do ciclo da cultura e a disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  supera a forma amoniacal, independe da dose de ureia aplicada (MELO et al., 1980).

Aos 100 DAG em que as médias da enzima ARN para os tratamentos isolados teve efeito significativo, a atividade da enzima foi reduzida com uso do Mo (Tabela 6). Esse resultado difere dos encontrados por Santos (2014) que observou maior atividade da enzima ARN nas folhas da variedade RB867515 na presença de Mo, aos 100 dias após o plantio. A atividade da ARN é diretamente proporcional à disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  próximo ao sistema radicular da planta (DECHORGNAT, et al., 2011).

Provavelmente, este resultado não foi encontrado no presente estudo uma vez que o N foi fornecido na forma de ureia via fertirrigação e parcelado durante todo o período avaliado. Assim, disponibilidade de  $\text{NH}_4^+$  foi superior ao  $\text{NO}_3^-$  nas plantas adubadas com N, o que levou a atividade da enzima ARN a ser menor, mesmo na presença do Mo.

Com relação a capacidade das estirpes utilizadas em fixar o  $\text{N}_2$  atmosférico, verificou-se que as plantas inoculadas apresentaram menor AN aos 50 DAG, enquanto que aos 100 DAG a atividade média da enzima na folha aumentou e as plantas que receberam as bactérias apresentaram incrementos na AN na ordem de 45 e 64 % quando inoculada com a UAGC 865 e UAGC 869, respectivamente, em comparação as plantas não inoculadas, o que demonstra que as estirpes estudadas aumentaram a fixação do  $\text{N}_2$  atmosférico na cana planta (Tabela 5 e 6). Comportamento semelhante foi observado por Santos (2014) em condições de campo ao observar para a mesma variedade apresentou menores valores da AN aos 50 DAG alcançando a máxima atividade aos 100 DAG.

Como a AN foi menor aos 50 DAG, o efeito da adubação molíbdica não diferiu entre as plantas inoculadas, no entanto, aos 100 DAG a adição do Mo reduziu a AN nas plantas inoculadas com a bactéria UAGC 865 e não obteve diferença com uso da UAGC 869 (Tabela 5 e 6). Em média, verificou-se que a adubação molíbdica reduziu a AN na cana planta na ausência de N e não apresentou diferença significativa na nitrogenase quando aplicado em conjunto com a adubação nitrogenada (Tabela 5 e 6). Entretanto, a aplicação apenas do Mo estimulou a enzima nitrogenase para a linhagem UAGC 869 em  $84 \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$  o que corresponde a 25% da atividade da enzima com médias não significativas. Possivelmente, o Mo auxiliou a bactéria UAGC 869 conforme a especificidade dos isolados bacterianos à planta hospedeira e por isso, estas causaram maior atividade da enzima, bem como maior quantidade de N via fixação biológica como mostra a tabela 9 (LIMA, 2012).

**Tabela 5** - Clorofila total, atividade da redutase do nitrato e atividade da nitrogenase na variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 50 DAG sem e com Mo e N, e inoculação com bactérias diazotróficas.

		CT				ARN				AN			
		mg gMF				$\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gMF}$				$\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$			
Fator		N (g vaso <sup>-1</sup> )				N (g vaso <sup>-1</sup> )				N (g vaso <sup>-1</sup> )			
Bactéria	Mo (g vaso <sup>-1</sup> )	0	2,90	Média	0	2,90	Média	0	2,90	Média	0	2,90	Média
Sem	0	30,9 aA	22,1 aA	26,5	3,36 aB	2,76 aAB	3,06	251,62	111,90	181,76	0	2,90	Média
	0,90	25,3 aAB	29,7 aA	27,5	3,36 aB	2,69 bB	3,03	183,41	109,21	146,31			
UAGC 865	0	16,9 bB	32,6 aA	24,8	4,16 aA	3,36 bA	3,76	136,79	71,48	104,14			
	0,90	20,9 aAB	32,0 aA	26,5	2,76 aB	2,76 aAB	2,76	129,52	77,87	103,70			
UAGC 869	0	29,6 aAB	24,3 aA	27,0	2,76 aB	2,56 aB	2,66	162,78	133,76	148,27			
	0,90	23,0 aAB	25,4 aA	24,3	2,96 bB	3,76 aA	3,36	107,37	169,68	138,53			
<b>Média</b>	0	25,8	26,4		3,43	2,89		183,73	105,71				
	0,90	23,1	29,1		3,03	3,07		140,10	118,92				
		<b>Bactéria</b>				<b>Bactéria</b>				<b>Bactéria</b>			
N (g vaso <sup>-1</sup> )	Sem	UAGC 865	UAGC 869	<b>Média</b>	Sem	UAGC 865	UAGC 869	<b>Média</b>	Sem	UAGC 865	UAGC 869	<b>Média</b>	
0	28,1	18,9	26,3	24,4	3,36	3,46	2,86	3,23	217,52aA	133,16bA	135,08bA	161,92	
2,90	25,9	32,3	24,8	27,7	2,72	3,06	3,16	2,98	110,56bB	74,68cB	151,72aA	112,32	
<b>Média</b>	27,0	25,6	25,6		3,04	3,26	3,01		164,04	103,92	143,40		
<b>Mo(g vaso<sup>-1</sup>)</b>													
0	26,5	24,8	26,96	26,0	3,06	3,76	2,66	3,16	181,76aA	104,14bA	148,27bA	144,72	
0,90	27,5	26,5	24,26	26,1	3,02	2,76	3,36	3,05	146,31aA	103,70bA	138,53abA	129,51	
<b>Média</b>	27,0	25,6	25,61		3,04	3,26	3,01		164,04	103,92	143,40		
		<b>Mo (g vaso<sup>-1</sup>)</b>				<b>Mo (g vaso<sup>-1</sup>)</b>				<b>Mo (g vaso<sup>-1</sup>)</b>			
N (g vaso <sup>-1</sup> )	0	0,90	<b>média</b>		0	0,90	<b>média</b>		0	0,90	<b>média</b>		
0	25,8	23,1	24,4		3,43	3,03	3,23		183,73aA	140,10bA	161,92		
2,90	26,3	29,0	27,7		2,89	3,07	2,98		105,72aB	118,92aA	112,32		
<b>Média</b>	26,0	26,1			3,16	3,05			144,73	129,51			
		<b>F</b>				<b>F</b>				<b>F</b>			
N		4,66*				12,17*				42,71*			
Mo		0,00 <sup>ns</sup>				3,41**				4,02***			
Bactéria		0,40 <sup>ns</sup>				6,37*				20,35*			
Mo*Bac		0,82 <sup>ns</sup>				48,32*				1,92 <sup>ns</sup>			
N*Bac		10,84*				15,40*				24,43*			
N*Mo		3,2***				20,36*				14,02*			
N*Mo*Bac		3,01***				6,66*				2,13 <sup>ns</sup>			
CV (%)		6,13				10,75				13,88			

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \*, \*\* e \*\*\* significativo a 1%, 5% e 10% respectivamente. CT: Clorofila Total; ARN: Redutase do Nitrato; AN: Nitrogenase.

**Tabela 6** - Médias da avaliação da Clorofila total e das enzimas Redutase do Nitrato e Nitrogenase da variedade RB867515 de cana-de-açúcar com 100 DAG sem e com Mo e N e inoculação com bactérias diazotróficas.

	Clorofila total			Redutase do nitrato			Nitrogenase					
	mg gMF			μmol NO <sub>2</sub> h <sup>-1</sup> gMF			μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> h <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup>					
	Mo (g vaso <sup>-1</sup> )			Mo (g vaso <sup>-1</sup> )			Mo (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )		
<b>Bactéria</b>	0	0,9	<b>Média</b>	0	0,9	<b>Média</b>	0	0,9	<b>Média</b>	0	2,90	<b>Média</b>
Sem	20,0 aB	17,5 aA	18,8	4,92	4,48	4,70	329,51aB	381,52aA	355,51	425,52aA	285,51aA	355,51
UAGC 865	28,0 aA	20,3 bA	24,2	4,17	3,63	3,90	829,07aA	288,03bA	558,55	852,07aA	265,03bA	558,55
UAGC 869	18,3 aB	20,5 aA	19,4	3,80	3,30	3,55	336,70aA	420,90aA	378,80	606,20aA	151,40bA	378,80
<b>Média</b>	22,1	19,4		4,30	3,80		498,42	363,28		627,93	233,98	
<b>N (g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0	21,6 aA	15,9 bB	18,8	4,63	4,27	4,45	783,42aA	472,44bA	627,93	-	-	-
2,90	22,8 aA	23,1 aA	23,0	3,37	3,34	3,36	213,43aA	254,53aB	233,98	-	-	-
<b>Média</b>	22,2	19,5		4,00	3,81		498,42	363,48		-	-	-
<b>Mo(g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0		19,5			4,30 A				498,43			
0,90		22,2			3,81 B				363,49			
<b>Média</b>		20,9			4,06				430,96			
<b>Bactéria</b>												
Sem		18,9			4,71 A				355,52			
UAGC 865		24,1			3,90 B				558,55			
UAGC 869		19,4			3,55 B				378,80			
<b>Média</b>		20,8			4,05				430,95			
<b>N (g vaso<sup>-1</sup>)</b>												
0		18,7			4,45 A				233,98			
2,90		22,9			3,65 B				627,93			
<b>Média</b>		20,8			4,05				430,95			
		F			F				F			
N		11,40*			8,88*				31,56*			
Mo		4,71**			3,39***				4,33**			
Bactéria		6,69**			6,36*				1,08 <sup>ns</sup>			
Mo*Bac		5,12**			0,01 <sup>ns</sup>				3,17**			
N*Bac		0,89 <sup>ns</sup>			0,80 <sup>ns</sup>				3,14**			
N*Mo		5,69**			0,24 <sup>ns</sup>				4,83**			
N*Mo*Bac		0,37 <sup>ns</sup>			2,40 <sup>ns</sup>				0,68 <sup>ns</sup>			
CV (%)		16,02			18,23				10,46			

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \*, \*\* e \*\*\* significativo a 1%, 5% e 10% respectivamente. CT: Clorofila Total; ARN: Redutase do Nitrato; AN: Nitrogenase.

A adição do fertilizante nitrogenado inibiu a atividade da AN em ambos os tempos, sendo verificado aos 50 DAG redução de 44 % e 49 %, respectivamente nas plantas inoculadas com a UAGC 865 e não inoculadas. Aos 100 DAG a adubação nitrogenada reduziu AN em 63 % e 86 % nas plantas inoculadas com as bactérias UAGC 865 e UAGC 869 respectivamente. A aplicação de adubo nitrogenado limita a FBN. Este resultado é confirmado quando observamos a %N<sub>df</sub>fix em ambos os tempos de avaliação, em que a aplicação do adubo nitrogenado a FBN foi cessada (Tabela 8 e 9).

Esse resultado corrobora com os de Ayuni et al. (2015) que avaliando o efeito do adubo nitrogenado na cultura do arroz em laboratório sob diferentes níveis de ureia, observou que a aplicação do adubo reduziu a atividade da nitrogenase bem como, influenciou negativamente o desenvolvimento de *Stenotrophomonas maltophilia*. As bactérias mostraram maior atividade da enzima quando não aplicado N e a aplicação de 50 mg L<sup>-1</sup> de ureia reduziu em 25% a atividade da enzima. A atividade foi totalmente inibida quando aplicado 300 mg L<sup>-1</sup> do adubo.

Com relação ao teor de clorofila, aos 50 DAG não houveram incrementos significativos com a adição de Mo nas plantas inoculadas com as bactérias diazotróficas, quando associadas a adubação nitrogenada, com exceção das plantas inoculadas com a bactéria UAGC 865 que obteve aumento da CT sem a presença do Mo em ambos os tempos avaliados aos (Tabelas 5 e 6). Aos 100 DAG a adubação molíbdica aumentou em 49 % o teor de clorofila das folhas nas plantas adubadas com N (Tabela 6).

Na segunda fase de crescimento, a cana-de-açúcar demonstrou que a adubação molíbdica foi necessária para aumentar o teor de clorofila das folhas nas plantas adubadas com N, entretanto nas plantas mais novas o Mo obteve baixa participação na nutrição nitrogenada da cana planta, evidenciando que adubação nitrogenada é a principal fonte de N. Franco et al. (2011) demonstrou em estudo de campo a importância da adubação nitrogenada nas fases iniciais de crescimento da cana planta e observaram que o aproveitamento do N-fertilizante variou entre 20% e 40% até os 180 dias após o plantio e que após esse período outras fontes supriram a demanda de N pela planta, reduzindo a contribuição do N oriundo da adubação.

### **4.3. Diluição isotópica**

As médias da abundância de átomos de <sup>15</sup>N em excesso na folha +1, a extração total de N e contribuição do N<sub>2</sub> fixado e do solo para os tempos 50 e 100 DAG, são

apresentados na tabela 7. De modo qualitativo a fixação do N<sub>2</sub> atmosférico foi inibida com aplicação de N, visto que a porcentagem de <sup>15</sup>N nesses tratamentos foram mais próximas à marcação do solo, estimada em 2%. De mesmo modo, em média, a %Ndffix dos tratamentos sem aplicação de N foram 15,12 % e 41,85% superiores quando comparados à %Ndfsolo dos tratamentos com a aplicação do adubo nitrogenado aos 50 e 100 DAG respectivamente. Em contrapartida, a %Ndfsolo para os tratamentos com N foram em média, na ordem de 99%. Estes resultados mostram que a aplicação de N na cana-de-açúcar limita a FBN em 100% e por este motivo, o tratamento cana adubada com N foi considerado como referência padrão neste estudo.

Este resultado corrobora com os dados de Taulé et al. (2012) que avaliando a contribuição da FBN em variedades de cana-de-açúcar da região norte do Uruguai sob condições controladas e vasos com solo esterilizado observaram que o aumento de 10 mg kg<sup>-1</sup> para 50 mg kg<sup>-1</sup> de sulfato de amônio promoveu redução de 20% no %Ndffix quando utilizado o sorgo como referência.

Nas plantas controle, que não receberam o N, a diluição isotópica do <sup>15</sup>N foi maior para os dois tempos avaliados (Tabela 7). A menor participação de átomos de <sup>15</sup>N no tratamento controle demonstrou que a cana-de-açúcar realiza a FBN naturalmente sem a necessidade de inoculantes, sendo observado contribuição de 18,44% e 48,76% do N<sub>2</sub> atmosférico fixado aos 50 e 100 DAG respectivamente. Este resultado corrobora com os resultados da nitrogenase descritos neste trabalho, em que foi verificada maior atividade da enzima na segunda fase de avaliação da cana planta.

Entre os tratamentos sem N, as plantas inoculadas com a bactéria UAGC 865 aos 50 DAG e as plantas inoculadas com a bactéria UAGC 869 na presença do Mo nos dois tempos apresentaram a diluição isotópica semelhante as plantas controle, porém a quantidade de N acumulado na parte aérea e a QNdffix foi maior, principalmente aos 100 DAG quando a FBN foi mais elevada (Tabela 7). Esse resultado corrobora com os dados de nitrogenase que foram mais elevados para a linhagem 869 aos 100 DAG sem a aplicação de N (Tabela 6).

**Tabela 7** - Abundância de átomos de <sup>15</sup>N, acúmulo de N na parte aérea (QNT), contribuição do nitrogênio derivado da fixação (%Ndffix), quantidade de N derivado da fixação (QNdffix), contribuição do nitrogênio derivado do solo (%Ndfsolo), quantidade de N derivado do solo (QNdfsolo) na variedade RB867515 com e sem aplicação de adubo nitrogenado (2,90 g vaso<sup>-1</sup> de ureia).

Tratamento	<sup>15</sup> N	σ	QNT	50 dias							
				σ	Ndffix	σ	Q\Ndffix	σ	Ndfsolo	σ	

		%		mg planta <sup>-1</sup>		%		mg planta <sup>-1</sup>		%	
sem N	000	1,43	0,02	53,45	2,49	18,44	0,88	10,36	0,05	78,79	5,60
	B1	1,47	0,06	73,17	5,40	15,90	3,18	10,83	4,05	84,10	3,18
	B2	1,53	0,01	35,71	1,16	12,81	0,62	4,59	0,37	87,19	0,62
	Mo	1,59	0,18	43,56	0,46	13,31	1,53	7,65	0,78	84,46	3,51
	MoB1	1,56	0,06	62,47	0,00	15,00	0,00	9,37	0,00	85,00	0,00
	MoB2	1,48	0,07	71,97	1,98	15,27	4,07	11,11	3,23	84,73	4,07
	<b>Média</b>	<b>1,51</b>	<b>0,07</b>	<b>56,72</b>	<b>1,92</b>	<b>15,12</b>	<b>1,71</b>	<b>8,99</b>	<b>1,41</b>	<b>84,05</b>	<b>2,83</b>
Com N	N	1,75	0,13	161,53	9,08	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	NB1	1,84	0,04	181,34	26,52	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	NB2	1,83	0,02	157,66	12,82	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	NMo	1,80	0,10	201,80	5,12	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	NMoB1	1,81	0,23	171,95	1,40	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	NMoB2	1,79	0,03	119,56	5,63	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	<b>Média</b>	<b>1,80</b>	<b>0,09</b>	<b>165,64</b>	<b>10,10</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>100,00</b>	<b>0,00</b>
<b>100 dias</b>											
Tratamento		<b>15N</b>	<b>σ</b>	<b>QNT</b>	<b>σ</b>	<b>Ndffix</b>	<b>σ</b>	<b>QNdffix</b>	<b>σ</b>	<b>Ndfsolo</b>	<b>σ</b>
		%		mg planta <sup>-1</sup>		%		mg planta <sup>-1</sup>		%	
sem N	000	0,80	0,18	13,17	0,62	48,76	6,12	7,93	0,02	51,24	6,12
	B1	1,10	0,17	38,35	0,52	40,02	3,85	14,37	0,70	59,98	3,85
	B2	1,21	0,26	18,29	0,05	33,97	3,16	12,58	1,07	66,03	3,16
	Mo	1,10	0,09	33,31	0,49	43,59	2,20	13,39	1,42	56,41	2,20
	MoB1	1,04	0,23	44,05	16,13	45,91	1,38	29,42	1,25	54,09	1,38
	MoB2	0,91	0,15	51,58	27,98	50,08	2,79	38,72	5,39	49,92	2,79
	<b>Média</b>	<b>1,03</b>	<b>0,18</b>	<b>33,13</b>	<b>7,63</b>	<b>43,72</b>	<b>3,25</b>	<b>19,40</b>	<b>1,64</b>	<b>56,28</b>	<b>3,25</b>
Com N	N	1,83	0,02	351,23	82,62	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	NB1	1,83	0,01	390,36	146,03	0,00	0,00	0,00	0,00	100	0,00
	NB2	1,84	0,03	278,83	36,16	0,55	0,22	1,74	0,47	99,73	0,39
	NMo	1,76	0,03	260,40	30,47	4,79	0,41	13,56	0,94	96,34	1,51
	NMoB1	1,78	0,01	240,58	31,95	2,53	0,30	6,08	1,06	97,32	0,42
	NMoB2	1,80	0,03	588,76	113,82	3,34	0,72	17,50	4,83	98,16	1,89
	<b>Média</b>	<b>1,81</b>	<b>0,02</b>	<b>351,69</b>	<b>73,51</b>	<b>1,87</b>	<b>0,28</b>	<b>6,48</b>	<b>1,22</b>	<b>98,59</b>	<b>0,70</b>

N: Com nitrogênio; Mo: Com molibdênio; B1: Com bactéria UAGC 865; B2: Com bactéria UAGC 869; <sup>15</sup>N: Porcentagem de <sup>15</sup>N na folha +1; QNT: Extração de nitrogênio total; %Ndffix: Porcentagem de nitrogênio derivado da FBN; QNdffix: Quantidade de nitrogênio derivado da fixação; %Ndfsolo: Porcentagem de nitrogênio derivado do solo.

Na primeira fase de crescimento, aos 50 DAG o efeito positivo da adubação molíbdica no QNT apenas foi observado nas plantas inoculadas com a UAGC 869 no qual foi observado incrementos de 18,52 mg planta<sup>-1</sup> (35%) em relação as plantas não inoculadas e de 36,26 mg planta<sup>-1</sup> (101,5%) em relação a não aplicação do Mo (Tabela 8). Contudo, quando foi adicionado o adubo nitrogenado combinada à bactéria UAGC 869, houve redução dos valores do QNT com a adição do Mo em torno de 38,11 mg planta<sup>-1</sup> (24%).

Nas plantas não inoculadas e inoculadas com UAGC 865, não ocorreram diferenças significativas com a adição do Mo para o N acumulado na parte aérea aos 50 DAG, independente da aplicação de N.

Aos 100 DAG houve interação positiva entre a estirpe UAGC 869 e o Mo, no qual, na ausência e principalmente na presença da adubação nitrogenada, foram verificados incrementos de 33,29 mg planta<sup>-1</sup> (182%) e 309,93 mg planta<sup>-1</sup> (111,15%) na extração do N pela parte aérea. Também, observa-se que houve incremento da QNT nas plantas não inoculadas, com a aplicação do adubo molíbdico aos 100 DAG apresentando incrementos na ordem de 19,90 mg planta<sup>-1</sup> (149%) quando não aplicado N. Este resultado corrobora com os dados de AN apresentados em que a aplicação do Mo, sem N foi elevada em 17%.

Aos 50 DAG, nas plantas que não receberam N, a adubação com Mo aumentou a quantidade do N<sub>2</sub> atmosférico nas plantas quando inoculadas apenas com a UAGC 869, sendo observado incrementos de 6,53 mg planta<sup>-1</sup> (142,5%) devido ao aumento de 2,46% na contribuição de N<sub>df</sub>fix (Tabela 8).

Aos 100 DAG, quando a QNT foi maior e a FBN mais elevada, a quantidade de N fixado foi maior com uso do Mo em todos os tratamentos, sendo observado incrementos de 5,46 mg planta<sup>-1</sup> (69%) no tratamento controle, de 15,04 mg planta<sup>-1</sup> (105%) com a bactéria UAGC 865 e de 26,14 mg planta<sup>-1</sup> (208%) com a bactéria UAGC 869, apresentando contribuição crescente de 43,6%, 45,9% e 50,07% do N<sub>df</sub>fix, respectivamente (Tabela 9).

Apesar da presença significativa da FBN nas plantas não adubadas com N, a produção BSPA e a extração de N pela parte aérea foi menor que as plantas adubadas com N (Tabelas 4; 7; 8 e 9). Segundo Araújo et al. (2015) que avaliou a inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em associação com a adubação nitrogenada em plantas de milho, a FBN contribuiu em média com 19,40% e 9,49% do N

necessário ao desenvolvimento das plantas de milho respectivamente, o que teve pequena participação no total de N acumulado na parte aérea e na produção de biomassa.

**Tabela 8** - Contribuição do nitrogênio derivado do solo e da FBN em % e teor de nitrogênio total (QNT) em mg planta<sup>-1</sup> da variedade RB867515 aos 50 DAG com e sem aplicação de adubo nitrogenado (2,90 g vaso<sup>-1</sup> de ureia).

Fator	QNT mg planta <sup>-1</sup>				Ndffix %			QNdffix mg planta <sup>-1</sup>			Ndfsolo %		
	Mo (g vaso <sup>-1</sup> )	N (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )		
		0	2,90	Média	0	2,90	Média	0	2,90	Média	0	2,90	Média
Bactéria	0	53,44 bAB	161,53 aAB	107,49	18,44 aA	0,00 bA	9,22	10,36 aAB	0,00 bA	5,18	78,79 bB	100 aA	89,40
	0,90	43,55 bAB	201,80 aA	122,68	13,30 aB	0,00 bA	6,65	7,65 aB	0,00 bA	3,83	84,45 bA	100 aA	92,23
UAGC 865	0	73,17 bA	181,34 aA	127,26	15,90 aAB	0,00 bA	7,95	10,83 aAB	0,00 bA	5,42	84,09 bAB	100 aA	92,05
	0,90	62,47 bA	171,94 aAB	117,21	15,00 aAB	0,00 bA	7,50	9,37 aAB	0,00 bA	4,69	84,99 bA	100 aA	92,50
UAGC 869	0	35,70 bB	157,66 aB	96,68	12,81 aB	0,00 bA	6,41	4,58 aC	0,00 bA	2,29	87,18 bA	100 aA	93,59
	0,90	71,96 bA	119,55 aC	95,76	15,27 aAB	0,00 bA	7,64	11,11 aA	0,00 bA	5,56	84,72 bA	100 aA	92,36
Média	0	54,10	166,84		15,72	0,00		8,59	0,00		83,35	100	
	0,90	59,33	164,43		14,52	0,00		9,38	0,00		84,72	100	
		F			F			F			F		
N		1625,50*			9584,4*			4340,15*			518,22*		
Mo		0,27 <sup>ns</sup>			1,55 <sup>ns</sup>			2,03 <sup>ns</sup>			0,95 <sup>ns</sup>		
Bactéria		32,98*			1,55 <sup>ns</sup>			3,86**			3,31**		
Mo*Bac		7,46*			5,33*			14,34*			2,83***		
N*Bac		26,74*			1,55 <sup>ns</sup>			3,86**			3,31**		
N*Mo		2,00 <sup>ns</sup>			1,55 <sup>ns</sup>			2,03 <sup>ns</sup>			0,95 <sup>ns</sup>		
N*Mo*Bac		44,95*			5,33*			14,34*			2,83***		
CV (%)		8,41			7,07			10,51			2,63		

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \* e \*\*\* significativo a 1%, 5% e 10% respectivamente. <sup>15</sup>N: Porcentagem de <sup>15</sup>N na folha +1; QNT: Quantidade de nitrogênio total; Ndffix: Porcentagem de nitrogênio derivado da FBN; QNdffix: Quantidade de nitrogênio derivado da fixação; Ndfsolo: Porcentagem de nitrogênio derivado do solo.

**Tabela 9** - Contribuição do nitrogênio derivado do solo e da FBN em % e teor de nitrogênio total (QNT) em mg planta<sup>-1</sup> da variedade RB867515 aos 100 DAG com e sem aplicação de adubo nitrogenado (2,90 g vaso<sup>-1</sup> de ureia).

Fator	QNT mg planta <sup>-1</sup>				Ndffix %			QNdffix mg planta <sup>-1</sup>			Ndfsolo %		
	Mo (g vaso <sup>-1</sup> )	N (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )			N (g vaso <sup>-1</sup> )		
		0	2,90	Média	0	2,90	Média	0	2,90	Média	0	2,90	Média
Bactéria	0	13,36 bB	351,22 aAB	182,29	48,75 aA	0,00 bA	24,38	7,93 aD	0,00 bD	3,97	51,24 bBC	100 aA	75,62
	0,90	33,30 bA	260,39 aB	146,85	43,60 aAB	4,79 bA	24,20	13,39 bC	13,56 aA	13,48	56,40 bB	96,34 aA	76,37
UAGC 865	0	38,34 bA	390,36 aAB	214,35	40,01 aB	0,00 bA	20,01	14,37 aC	0,00 bD	7,19	59,98 bB	100 aA	79,99
	0,90	44,05 bA	240,58 aB	142,32	45,90 aA	2,52 bA	24,21	29,41 aB	6,08 bB	17,75	54,09 bBC	97,32 aA	75,71
UAGC 869	0	18,29 bB	278,83 aB	148,56	33,97 aC	0,54 bA	17,26	12,58 aC	1,73 bC	7,16	66,02 bA	99,72 aA	82,87
	0,90	51,58 bA	588,76 aA	320,17	50,07 aA	3,34 bA	26,71	38,72 aA	17,50 bA	28,11	49,92 bC	98,15 aA	74,04
Média	0	23,33	340,14		40,91	0,18		11,63	0,58		59,08	99,91	
	0,90	42,98	363,24		46,52	3,55		27,17	12,38		53,47	97,27	
		F			F			F			F		
N		1117,48*			3247,97*			1824,20*			3104,70*		
Mo		19,90*			37,42*			1856,73*			29,47*		
Bactéria		8,40*			4,13**			194,38*			3,80**		
Mo*Bac		15,89*			14,38*			2,96***			13,30*		
N*Bac		8,55*			2,13 <sup>ns</sup>			95,54*			1,85 <sup>ns</sup>		
N*Mo		19,23*			2,33**			386,44*			3,85**		
N*Mo*Bac		4,39*			21,06*			66,23*			19,72*		
CV (%)		5,5			11,16			5,23			3,39		

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey; <sup>ns</sup>não significativo, \*, \*\* e \*\*\* significativo a 1%, 5% e 10% respectivamente. <sup>15</sup>N: Porcentagem de <sup>15</sup>N na folha +1; QNT: Quantidade de nitrogênio total; Ndffix: Porcentagem de nitrogênio derivado da FBN; QNdffix: Quantidade de nitrogênio derivado da fixação; Ndfsolo: Porcentagem de nitrogênio derivado do solo.

A importância do Mo na fixação do N<sub>2</sub> atmosférico também foi observada nas plantas adubadas com N, no qual a adubação nitrogenada inibiu a próxima de zero a FBN na cana planta da variedade RB867515 em ambos tempos avaliados (Tabelas 8 e 9), no entanto com adição do Mo na adubação aos 100 DAG houve incremento na participação do N derivado da fixação biológica no total extraído pela planta, sendo verificado contribuição do N<sub>dfix</sub> na ordem de 4,79%, 2,52% e 3,34% nas plantas não inoculadas, e inoculadas com UAGC 865 e UAGC 869, respectivamente (Tabela 9).

Essa contribuição não foi suficiente para suprir toda a demanda da planta estimada em média de 164,43 mg planta<sup>-1</sup> e 363,24 mg planta<sup>-1</sup>, aos 50 e 100 DAG respectivamente. Apesar disso, a interação entre a bactérias e adubação nitrogenada se mostrou responsiva no presente estudo, principalmente quando adicionado o Mo na adubação (Tabela 4). Segundo Araújo et al. (2015) a inoculação de bactérias em plantas adubadas com N auxiliam na utilização do N-fertilizante, visto que elas podem estimular desenvolvimento de raízes, o que resulta na maior capacidade de absorção. O Mo entra como uma técnica de manipulação bioquímica e fisiológica da FBN que dependendo da simbiose, possibilita maior crescimento de raiz e por consequência maior absorção de N, o que beneficia os componentes de crescimento, fixação e produtividade (CALONEGO et al., 2010; ROSSI et al., 2012; VINHAL-FREITAS e RODRIGUES, 2010)

A partir dos resultados do N derivado da fixação, foi possível constatar nas fases iniciais de crescimento (50 DAG) da cana planta, que o solo contribuiu em média com 83,35% do nitrogênio absorvido nas plantas que não receberam o N e com 100% quando o N foi aplicado pela adubação (Tabelas 8). Nas plantas mais desenvolvidas, aos 100 DAG, a participação do solo na nutrição nitrogenada da cana planta que não recebeu N foi em média de 59,08% e nas plantas adubadas com N a contribuição do solo e do N-fertilizante foi de 99,91% (Tabela 9).

Fica evidente ao verificar que a adubação nitrogenada aumentou de 5 a 30 vezes a QNT da parte aérea aos 50 e 100 DAG respectivamente quando comparada com as plantas que não foram adubadas com N, o que se deve ao maior acúmulo de BSPA das plantas. Este resultado revela a importância da adubação nitrogenada na cultura da cana-de-açúcar, visto que esta é responsável por 92% do acúmulo de matéria seca, 91% do crescimento das plantas e 83% do desenvolvimento de raízes, no qual é considerado o nutriente mais limitante ao desenvolvimento das plantas (VALE et al., 2011).

## 5. CONCLUSÕES

- A aplicação do Mo estimula a FBN e incrementa o N total no ciclo de cana planta da variedade RB867515 com e sem adubo nitrogenado. Contudo o incremento obtido com o uso do micronutriente pela FBN é relativamente pequeno quando comparados ao incremento do N-fertilizante.
- A aplicação de N na cana-de-açúcar limita a FBN e por esse motivo, a cana adubada com N pode ser utilizada como planta referência nos estudos de diluição isotópica.
- O Mo estimula a FBN no ciclo de cana planta e incrementa a biomassa seca da parte aérea quando as plantas são adubadas com N, principalmente em estágios vegetativos mais avançados da variedade RB867515.
- A aplicação do adubo molibídico estimula a enzima nitrogenase quando não aplicado o adubo nitrogenado.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de inoculantes como alternativa de melhoria da adubação nitrogenada é realizada com sucesso em culturas leguminosas, entretanto não apresentam resultados consistentes em culturas de espécies não leguminosas. Dessa forma, são importantes trabalhos que utilizem técnicas de quantificação mais confiáveis e que possam viabilizar a utilização desses inóculos na agricultura com benefícios econômicos e ambientais, principalmente no que se refere a cultura da cana-de-açúcar.

Percebeu-se que a utilização de espécimes referência como o capim colônia (*Panicum maximum* L.) e a tiririca (*Cyperus rotundus* L.) na técnica de abundância natural de  $^{15}\text{N}$  como forma de avaliação da FBN na cana-de-açúcar gera resultados imprecisos, o que torna as espécies não recomendadas como planta controle não fixadora. Essas espécies apresentaram atividade da enzima nitrogenase três vezes superior ao da espécie utilizada como controle (cana de açúcar com adubação nitrogenada), bem como demonstraram contribuição de nitrogênio por via FBN, em média, de 52,13% e 36,81%, para o capim colônia e tiririca, respectivamente.

Embora existam estirpes selecionadas para a produção de inoculantes, a utilização desses como fonte alternativa de N na cana-de-açúcar não é comum, devido às baixas contribuições do nitrogênio via FBN, o que inviabiliza o uso.

A hipótese de que a aplicação do adubo molíbdico elevaria a atividade da enzima nitrogenase e a FBN a ponto de suprir parcialmente a adubação nitrogenada foi refutada, pois não foram observados incrementos na quantidade de nitrogênio total da planta que pudessem suprir a necessidade da cultura. Apesar disso, o Mo atuou em conjunto às bactérias diazotróficas estimulando o crescimento da planta e incrementando a matéria seca da parte aérea, a enzima nitrogenase e a FBN da cana-de-açúcar, principalmente em estágios vegetativos mais avançados da cultura, quando não houve dependência nutricional entre a planta e o rebolo.

Por isso, faz-se necessário a continuidade de estudos sobre a contribuição do adubo molíbdico na FBN da cana-de-açúcar em cultivo em campo, de forma a obter mais conhecimentos sobre a associação do adubo com as bactérias dizotróficas e da eficiência dessa combinação.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAMAB, F.; KIMA, T. Y.; KIMA, S. Y.; ALAMA, S. S.; PRAMANIKC, P.; KIMAD, P. J.; LEE. Y. B. Effects of Rhizobium Inoculation on Nitrogen Fixation and Growth of Leguminous Green Manure Crop Hairy Vetch (*Vicia villosa* Roth). **Soil Science and Plant Nutrition**, p. 1–12, 2015.

ARAÚJO, E. de O.; MARTINS, M. R.; VITORINO, A. C. T.; MERCANTE, F. M.; CABALLERO, S. S. U. Effect of nitrogen fertilization associated with diazotrophic bacteria inoculation on nitrogen use efficiency and its biological fixation by corn determined using <sup>15</sup>N. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 643-650, 2015.

ARAÚJO, W. L. DE.; LACAVAL, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. DE S.; SOBRAL, J. K.; KLEINER, A. A. P.; AZEVEDO, J. L. DE. **Guia prático**: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Calo, 2010. 167 p.

ARAÚJO, W. L. DE.; LACAVAL, P. T.; MARCON, J.; LIMA, A. O. DE S.; SOBRAL, J. K.; KLEINER, A. A. P.; AZEVEDO, J. L. DE. **Guia prático**: Isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Calo. 167 p.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. Anuário Estatístico 2014 [da] ANDA. São Paulo, 2014, Anual.

AYUNI, N.; RADZIAH, O.; NAHER, U. A. A.; PANHWAR, Q.A.; HALIMI, M. S. Effect of nitrogen on nitrogenase activity of diazotrophs and total bacterial population in rice soil. **Journal of Animal and Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 1358–1364, 2015.

BODDEY, L. H. et al. **A Avaliação da Fixação Biológica de N<sub>2</sub> Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática**. Seropédica – RJ: Embrapa Agrobiologia, 2007.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. ALVES, B.J.R.; REIS, V.M. Endophytic nitrogen fixation in sugar cane: present knowledge and future applications. **Plant Soil**, v. 252, p. 139–149, 2003.

BOUYOUCOS, G. J. Estimation of the colloidal material in soils. **Science**, v. 64, p. 362, 1926.

CALONEGO, J. C.; JUNIOR, E. U. R.; BARBOSA, R. D.; LEITE, G. H. P.; FILHO, H. G. Adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro com suplementação de molibdênio via foliar1. **Revista Ciencia Agronomica**, p. 41 n. 3, p. 334–340, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. v.2, . Brasília: CONAB, 2015, 33 p.

DE CARVALHO, T. L. G.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Sugarcane Genetic Controls Involved in the Association with Beneficial Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria. **Tropical Plant Biology**, v. 4 n. 1, p. 31–41, 2011.

DE OLIVEIRA, E. C. A., FREIRE, F. J., DE OLIVEIRA, A. C., NETO, D. E. S., DA ROCHA, A. T., & DE CARVALHO, L. A. Produtividade, eficiência de uso da água e qualidade tecnológica de cana-de-açúcar submetida a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 46 n. 6, p. 617–625, 2011.

DE OLIVEIRA; R. I.; DE MEDEIROS; M. R. F. A.; FREIRE, C. S.; FREIRE, F. J.; SIMÕES NETO, D. E.; DE OLIVEIRA, E. C. A. Nutrient partitioning and nutritional requirement in sugarcane. **Australian Journal of Crop Science**. v. 10, n. 1, p. 69–75, 2016.

DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62 n. 4, p. 1349-1359, 2011.

DO VALE, D. W.; DE M. PRADO; R., AVALHÃES; C. C.; HOJO, R. H. Omissão de macronutrientes na nutrição e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6 n. 2, p. 189–196, 2011.

DOS SANTOS, R. L. **Molibdênio no metabolismo e na fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar**. 2014. 135 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Solos/Embrapa Informática Agropecuária/Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análise de solos. 2 ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1997. 212p.

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; CARDOSO, A. A.; FONTES, P. C. R.; VIEIRA, C. Características agrônômicas do feijoeiro em função do molibdênio contido na semente e da sua aplicação via foliar. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, v. 25, p. 65-72, 2003.

FRANCO, H.C.J.; OTTO R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, São Paulo, v.121, p. 29-41, 2011.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, São Paulo, v. 36, p. 2086–2097, 2008.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The Acetylene - Ethylene Assay for N<sub>2</sub> Fixation: Laboratory and Field Evaluation. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1185–1207, 1968.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

KIEHL, E. J. **Manual de Edafologia: relações solo-planta**. São Paulo: Ceres, 1979. 262 p.

KLUTE, E. D. **Methods of soil analysis, part 1- physical and mineralogical methods**. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, 2 ed., 1986. 1188 p.

KÖPPEN, W. Climatologia: com um estudo de los climas de la tierra. Publications In: **Climatology**: Laboratory of Climatology, 1948. New Jersey. 104p.

LEAMER, R.W.; SHAW, B. A simple apparatus for measuring noncapillary porosity an extensive scale. **Journal of American Society of Agronomy**, Washington, v.33, p.1003-1008, 1941.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current protocols in food analytical chemistry**, New York p. F4.3.1-F4.3.8., 2001.

LIMA, D. R. M. de. **Bactérias fixadoras de nitrogênio associadas a plantas de cana-de-açúcar cultivadas em Pernambuco**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2012.

MARTINS, R. N. L.; SIMÃO, R.; NÓBREGA, A.; SILVA, A. F. T.; NÓBREGA, J. C. A.; AMARAL, F. H. C.; COSTA, E. M.; FILHO, J. F. L.; MARTINS, L. V. Nitrogênio e micronutrientes na produção de grãos de feijão-caupi inoculado. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 4, p. 1577-1586, 2013.

MELO, F.A.F.; POSSÍDIO, E.L.; ARAÚJO, J.P.; ABRAMOFE, L.; COSTA, O.A.; KIEHL, J.C. Efeito da adição de ureia e do sulfato de amônio sobre a nitrificação em solo ácido. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO, 14., Cuiabá, 1980. **Anais**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1980. p.77-81.

MENGEL K.; KIRKBY E.A. **Principles of Plant Nutrition**. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2001. 849p.

NOBILE, F. O. NGUYEN, C. T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F.X. Variáveis biométricas da cana-de-açúcar fertilizada com resíduos orgânico e industrial e irrigada com água servida e potável. **Engenharia Agrícola**, p. 193-200, 2011.

OLIVEIRA, A. C. DE. **Interação da adubação nitrogenada e molíbdica em cana-de-açúcar**. 2012. 96 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012a.

OLIVEIRA, A.L.M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I.; HARTMANN, M. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. European Journal of Soil Biology, v. 45, n. 1, p. 106–113, 2009.

OLIVEIRA, C. A. de. **Estimativas da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar por  $\delta^{15}\text{N}$** . 2012b. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agronômico de Campinas. Brasil. 2012b.

OLIVEIRA, E. C. A.; DE OLIVEIRA, R. I. DE.; DE ANDRADE, B. M. T.; FREIRE, F. J.; JÚNIOR, M. A. L.; MACHADO, P. R. Crescimento e acúmulo de matéria seca em variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Engenharia Agrícola e Ambiental**, n. 19, p. 951–960, 2010.

OLIVEIRA, L. B. Determinação da macro e microporosidade pela “mesa de tensão” em amostras de solo com estrutura indeformada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, p. 197-200, 1968.

OTTO, R.; MULVANEY, R. L.; KHAN, S. A.; TRIVELIN, P. C. O. Quantifying soil nitrogen mineralization to improve fertilizer nitrogen management of sugarcane. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49 n. 7, p. 893–904, 2013.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H. Outras culturas industriais. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; FURLANI, A.M.C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: Fundação IAC, 1996. p. 233-243.

RECHIATU, A.; NANA, E.; CLEMENT, A. R. Response of Soybean (*Glycine max* L.) to Rhizobia Inoculation and Molybdenum Application in the Northern Savannah Zones of Ghana. **Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 2, p. 64-70, 2015.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Fixação biológica do nitrogênio – Estado da arte. In: AQUINO, A. M. de; ASSIS, R. L. de (Ed.) **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 368p.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético. Censo Varietal – Variedades RB, Participação, uso e manejo. Sociedade dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil. 2015. Disponível em: <<http://www.stab.org.br>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

ROSSI, R.L.; DA SILVA, T. R. B.; TRUGILO, D. P.; REIS, A. C. DE S.; DE FARIAS, E CARLOS M. Q.. Adubação foliar com molibdênio na cultura da soja. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 1, n. 1, p. 12-23, 2012.

SABINO, D. C. C.; FERREIRA, J. S.; GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, V. L. D. Bactérias diazotróficas como promotoras do desenvolvimento inicial de plântulas de arroz. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 15, 2012.

SANTOS, C. L. R. dos; CAZETTA, J. O.; SARAN, L. M.; SANCHES, A. Otimização da análise da atividade da redutase do nitrato e sua caracterização em folhas de cana-de-açúcar. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 49, n. 5, p. 384-394, 2014.

SANTOS, M. M., GALVÃO, J. C. C., SILVA, I. R., MIRANDA, G. V., & FINGER, F. L. Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em plantio direto, e alocação do nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) na planta. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, v. 34 n. 4, p. 1185–1194, 2010.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A. DA.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A., PEREIRA W.; DA SILVA, M. F.; BALDANI J. I.; BODDEY R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Do Solo**, v. 38, n. 2, p. 407–414, 2014.

SCHWARZ, G.; MENDEL, R. R.; RIBBE, M. W. Molybdenum cofactors, enzymes and pathways. **Nature**, v. 460, n. 7257, p. 839-847, 2009.

SECEX/MDIC. Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. **Balança comercial Brasileira**. Diversos números. Disponível em: < <http://www.desenvolvimento.gov.br>>.

SOUSA, D. M. G. de; LOBATO, E. (Ed.). In: Embrapa Informação Tecnológica. **Cerrado: correção do solo e adubação**. Brasília, Embrapa, 2004. 2 ed. p. 416.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 35–49, 2012.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. DE; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA E SÁ, J.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and <sup>15</sup>N natural abundance data for the contribution of biological N<sub>2</sub> fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5–21, 2012.

VINHAL-FREITAS, I. C., & RODRIGUES, M. B. Fixação Biológica Do Nitrogênio Na Cultura Do Milho. **Agropecuária Técnica**, v. 31, n. 2, p. 143–154, 2010.

WALKLEY, A.; BLACK, I.A. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and proposed modification of the chromic acid titration method. **Soil Science**, v. 63, p. 29-38, 1934.

