

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**MAGDA ALINE DA SILVA**

**ADUBAÇÃO MOLÍBDICA E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA CANA-DE-  
AÇÚCAR**

**RECIFE - PE**

**2020**



Magda Aline da Silva  
Engenheira Agrônoma

**Adubação molíbdica e Bactérias promotoras de crescimento na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

**Orientador**

Prof. Dr. Emídio Cantídio Almeida de Oliveira

**Coorientadores:**

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Dolores Santiago de Freitas

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Dr. Henrique Coutinho Junqueira Franco

RECIFE - PE

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M189a Silva, Magda Aline da Silva  
Adubação molébdica e Bactérias promotoras de crescimento na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar /  
Magda Aline da Silva Silva. - 2020.  
232 f. : il.

Orientador: Emidio Cantidio  
Almeida de Oliveira. Coorientador:  
Ana Dolores Santiago de Freitas.  
Inclui referências.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2020.

1. Fixação Biológica de Nitrogênio.. 2. Assimilação de N.. 3. Promoção de crescimento.. 4. Hormônios vegetais.. 5. Espectrometria de massas. Sustentabilidade.. I. Oliveira, Emidio Cantidio Almeida de, orient. II. Freitas, Ana Dolores Santiago de, coorient. III. Título

CDD 631.4

---

MAGDA ALINE DA SILVA

**Adubação molíbdica e Bactérias promotoras de crescimento na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020

---

Dr. Emídio Cantídio Almeida de Oliveira

Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Renato Lemos dos Santos

Instituto Federal de Pernambuco / Campus Vitória

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Dolores Santiago de Freitas

Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva

Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr<sup>a</sup>. Danúbia Ramos Moreira de Lima

Universidade Federal de Pernambuco



“O que é nascido de Deus vence o mundo; e esta é a vitória que vence o mundo: A nossa fé.”

**1 João 5:4**

Levanta! – disse a lua.

E nasceu um novo dia. O show tem que continuar! – disse o sol. A vida não para por ninguém. Te puxa pelo pé, quer você queira quer não, essa é a graça: a vida exige que você esqueça a saudade. A pele se desprende até que não reste parte alguma de você que ele tenha tocado seus olhos. Finalmente são só seus olhos. Não os olhos que olharam para ele. Você vai chegar ao fim e, além disso, é só o começo: vai lá! abre a porta para o mundo

– Tempo

*“O que o sol faz com as flores”*

**Rupi Kaur**



Claro que quero ser bem-sucedida, mas não busco sucesso pra mim. Preciso de sucesso para conseguir leite e mel suficiente para ajudar quem está em volta a chegar lá.

*"Outros jeitos de usar a boca"*

**Rupi Kaur**



Ao meu querido e amado esposo Elisson Lima cujo apoio, carinho, dedicação e companheirismo foram imprescindíveis nesta caminhada. Quando paro pra pensar na vida, são pessoas como você que me mostram o quanto é extraordinário sonhar, agradecer e amar cada pequeno momento. Felicidade é perceber o quanto esses pequenos momentos são mais importantes que qualquer outra coisa.

**Ofereço.**

*É muito bom quando podemos olhar para o nosso lado e vermos os amigos que estão, de alguma forma, sempre presentes e nunca nos deixam desanimar por qualquer motivo. Portanto, só posso ser grata a todos que me deram palavras de coragem e que lutaram comigo para que tudo isso fosse possível. Talvez, não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer a todos, que com o devido merecimento, contribuíram para que eu chegasse até aqui.*

*E eu tenho sorte de ter vocês, raros amigos, os quais são luz para meu caminho e tesouro para meus dias.*

**Dedico**



## **Agradecimento Especial,**

Motivação. É o impulso interno de alguém que influencia a sua própria direção. É o ingrediente chave para o sucesso e que te faz agradecer mais que lembrar todos os problemas. De alguma forma, ela nos faz enxergar o mundo de outra maneira.

Ah! Gratidão que faz o coração ser inocente a ponto que de forma sincera reconhece os grandes. E de granditude tu és repleto. E de muitos salves tu, amigo, parceiro, professor **Renato Lemos dos Santos** te configuram praticamente um herói. E não importa como. Os meios não justificam os fins. Tu és referência para mim. Referência em humildade, fé, generosidade, integridade, honestidade. Se eu for te descrever por completo, talvez, os homens descubram o teu segredo.

E as asas que perdestes outrora, Deus irá restituir. E assim, expresso meu imenso e profundo “obrigada” que perto de tantas coisas que já fizestes, tem pequenez no tamanho e na importância. Muita luz e bênçãos em sua vida. Deus te ilumine. Sempre ...



## AGRADECIMENTOS

Dizem que a gratidão tem o poder de transformar vidas porque é no momento de agradecer que abrimos nossos olhos para apreciar todas as bênçãos nos foram proporcionadas em um determinado momento da vida. Quando praticada, ela nos faz acreditar que um mundo melhor existe, e que conseguimos encontrar novos desafios, novos sonhos, uma nova razão para enfrentar a vida. Felicidade é viver podendo ser grato a tudo que Deus nos proporcionou.

Por este motivo, início esse texto agradecendo a Deus, meu Pai maravilhoso, por me dar muito mais do que preciso e por me abençoar muito mais do que mereço. Teus planos em minha vida são sempre maiores do que meus sonhos e teu amor por mim me faz conquistar maravilhas na terra.

À minha família, pela vida que me foi concedida, pelos aprendizados, pelos valores e por tudo que foi importante para eu me tornar quem eu sou. Sou grata por me dar impulso para vencer, correr atrás dos meus sonhos e nunca desistir de nada. Tudo isso vocês me ensinaram.

À minha mãe, que por maior que fosse o sacrifício não cedeu à tentação de desistir, porque a tempestade passa e logo chega à vitória. Sua força, dedicação e lutas são inspiração para mim e não há espaço nem palavras para descrever o tamanho da minha admiração por sua história.

Ao meu esposo, pelas coisas maravilhosas e lindas que já aconteceram em nossas vidas. Temos provado que juntos somos mais fortes, e com isso, cada obstáculo tem sido superado. Eu sei que construir um relacionamento sólido não é uma tarefa fácil, mas acredito que estejamos conseguindo com sucesso, pois independente de qualquer coisa, estamos vivendo um relacionamento forte, sincero, intenso e consistente. Encontrar alguém como você tornou minha vida mais fácil, mais linda e mais colorida.

À minha sogra, Maria Cristina, que nenhuma forma de carinho seria suficiente para expressar a gratidão que tenho por Deus me ter dado você. Você sempre deixou sua marca, sempre revelou o quanto seu coração é grande e maravilhoso. É um exemplo de mulher para mim e o ser humano mais bonito que algum dia encontrei neste mundo. Obrigada por sempre me dar forças.

À família Lima, que me apoiou em momentos difíceis e a todo momento celebrou esta etapa. Vocês foram um presente divino. E não importa se é família de sangue ou de coração,

pois o importante é que exista amor, e vocês me lembram todos os dias os motivos que tenho para agradecer.

À minha amiga Cíntia Teixeira, que apareceu em um dos momentos difíceis da minha vida para me mostrar que não existe a possibilidade de desistir. Você é simplesmente alguém que me ensinou a ver a vida com outros olhos, e deu um rumo às minhas perturbações, e me ajudou a levantar sempre que precisei me chacoalhando para seguir em frente. Eu sei que teremos muitas parcerias juntas no mundo científico e que você sempre estará comigo.

Aos meus amigos Severino Amâncio e Jane Lima, que nos momentos mais difíceis tinham um ensinamento que apresentava uma palavra de apoio. Vocês me ajudaram e tranquilizaram frente a todos os problemas que não foram poucos. Um sentimento que, me atrevo a falar, se transformou em irmandade.

Aos meus amigos Augusto Cesar e Dilene Nicolau, que entre tantas escolhas e tantos amigos, Deus me deu sabedoria para escolher vocês, pelo caminho, carinho, respeito e amizade. Como não me sentir honrada por ter vocês na minha vida? Vocês são exemplo pra mim. A amizade de vocês tem um enorme valor para mim e meu esposo e por isso queremos vocês nas nossas vidas sempre.

À minha estagiária e confidente maravilhosa Carolina Moreira, um anjo que Deus revelou em um dos momentos difíceis da minha vida. Eu tenho muito o que agradecer a você pelo apoio incondicional, por me fazer me sentir bem e por me fazer acreditar que tudo passa.

Ao professor Emídio Cantídio Almeida de Oliveira, pela confiança, orientação, ensinamentos e incentivos.

Aos professores Ana Dolores Santiago de Freitas, Giselle Gomes Monteiro Fracetto e Henrique Coutinho Junqueira Franco pela co-orientação, apoio, incentivo e atenção.

Aos professores Mario de Andrade Lira Junior, Fabiana Aparecida Cavalcante Silva, Tercilio Calsa Junior, Renato Lemos dos Santos e Edivan Rodrigues de Souza pela compreensão, conselhos e ensinamentos fundamentais ao meu crescimento profissional e ao desenvolvimento da pesquisa.

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

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

À toda equipe da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, em especial ao Grupo de Nutrição, Adubação e Fertilidade do Solo – GNAF, que me auxiliou na execução e conclusão das atividades deste trabalho: Em especial, aos estagiários Robson Hortêncio, Eduardo, Douglas, Larissa e a todos integrantes que tornaram este trabalho possível.

À toda equipe do Instituto Federal de Pernambuco – IFPE, campus Vitória de Santo Antão, sobretudo ao Grupo de Fertilidade do solo e Agroenergia, que me auxiliaram no experimento e atividades de laboratório, em especial, Lilian, Ebersson, Evaldo, Lluan, Lucas, Márcio, Mikaela, Raul, Kamylla, Adriene, Isabel, Eronildo, Ivanderson e Juca. Com vocês aprendi que Deus manda pessoas maravilhosas para nos ajudar a se levantar, a se reerguer.

A toda equipe da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, principalmente ao Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas – LGPP, particularmente à Elton, Lucas, Geise, José, Rodrigo, Rayssa e demais componentes que contituem o grupo mais divertido e animado que já conheci.

Aos colegas da Pós-Graduação em Ciência do Solo, em especial a Hidelblandi Farias, Danilo Rodrigues, Wildson de Moraes e Luan Rafael por estarem ao meu lado arrancando risos e consolando tristezas.

Aos funcionários da UFRPE, em especial a doce e amada Maria do Socorro que além de sua amizade e carinho, sempre tentou fazer a nossa rotina ser mais leve com sua dedicação.

À Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina - ECCAC, representada por Djalma Simões Neto por auxiliar com instalações laboratoriais para a pesquisa.

À usina São José e ao Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA, pela parceria e disponibilidade das sementes para realização do experimento.

À Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – UFAPE, representada pela professora Júlia Kuklinsky-Sobral, pela coorientação, apoio e parceria para execução e conclusão desta pesquisa.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE por ceder as instalações laboratoriais para análise e pesquisa.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA, representado pelo professor Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, pelo apoio e parceria para auxiliar com análises e determinação de isótopos.

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

Ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes pela concessão da bolsa.

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

**Grata.**

# ADUBAÇÃO MOLÍBDICA E BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA NUTRIÇÃO NITROGENADA DA CANA-DE-AÇÚCAR

## RESUMO GERAL

O molibdênio (Mo) é um micronutriente aniônico que apresenta papel fundamental em enzimas como a redutase do nitrato e a nitrogenase responsáveis pela assimilação do  $\text{NO}_3^-$  e pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), respectivamente. A redutase do nitrato atua no primeiro passo da redução do N-nítrico sendo fundamental na assimilação do nitrogênio. Em outra perspectiva, a FBN realizada por bactérias diazotróficas é considerado a principal forma natural de entrada de N em sistemas agrícolas e por este motivo é apontado como uma alternativa sustentável aos fertilizantes nitrogenados. Contudo, as contribuições obtidas pela inoculação de bactérias são pequenos e inconcisos, e por isso, os mecanismos de promoção de crescimento de plantas realizados por bactérias (BPCP) têm sido investigados no intuito de esclarecer e compreender qual(is) são mais atuantes no processo. Para este tipo de investigação, a análise das proteínas pode orientar o conhecimento desses mecanismos, uma vez que elas estão ligadas diretamente à formação de características fisiológicas que regulam fenótipos para se adaptar à determinadas mudanças. Diante do contexto foram realizados dois estudos: o primeiro para avaliar a contribuição das BPCP em conjunto com o adubo Mo e associado ao N na FBN na nutrição nitrogenada e no desenvolvimento da cana-de-açúcar e o segundo para identificar o conjunto de proteínas que são potencialmente acumuladas em resposta a aplicação do Mo, a inoculação e ao N na cana-de-açúcar. No primeiro estudo, foram realizados dois ciclos de cultivo e avaliados parâmetros de crescimento da planta, atividade da enzima redutase do nitrato, FBN, teores e acúmulos de nutrientes. No segundo estudo, plantas que apresentaram maior biomassa de parte aérea no primeiro estudo foram submetidas a extração de proteínas solúveis totais da folha +1 e realizada comparações em quatro perfis eletroforéticos SDS-PAGE para aplicação ou não do adubo molíbdico quando associado à inoculação do inoculante ST, GHABH quando combinado ou não à adubação nitrogenada. Nossos resultados demonstraram que o micronutriente associado ao inoculante ST foi mais atuante no processo de assimilação de N via  $\text{NO}_3^-$  enquanto que na associação com o inoculante GHABH foi mais atuante na FBN. Contudo, o incremento via fonte de FBN não foi suficiente para suprir a demanda da cultura, uma vez que a fonte fertilizante contribuiu com a maior parte da nutrição nitrogenada. Nesta perspectiva, a bactéria ST associada ao Mo apresentou os melhores resultados atuando como bioestimulante e apresentam potencial para uso como novo pacote tecnológico associados a doses de N intermediárias, uma vez que estimulam o melhor crescimento e desenvolvimento da planta e o melhor aproveitamento do N disponível mais eficiente. A proteômica comparativa encontrou 46 conjuntos de proteínas diferenciais, mas apenas 28 foram identificados (60,86%). A inoculação atua principalmente no acúmulo de proteínas relacionadas a absorção e metabolismo de N, enquanto que a inoculação de BPCP associado ao Mo atua no acúmulo de proteínas diferenciais relacionadas ao metabolismo do enxofre, fotossíntese e mecanismos hormonais, especialmente no que diz respeito às auxinas, ácido abscísico e etileno, na cultura da cana-de-açúcar. Nossa pesquisa apresenta como base um manejo de fertilidade eficiente e sustentável pela aplicação de um insumo viável e econômico. Esses resultados não apenas aprofundam nossa compreensão da influência do Mo no proteoma da cana-de-açúcar, mas também fornecem novas informações sobre o mecanismo molecular da cultura regulado pelo Mo e por BPCP. Deste modo, essa pesquisa é inovadora, e possibilita, em curto prazo, identificar alternativas sustentáveis, com custo reduzido para a cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Fixação Biológica de Nitrogênio. Assimilação de N. Promoção de crescimento. Hormônios vegetais. Espectrometria de massas. Sustentabilidade.



# MOLYBDIC FERTILIZATION AND GROWTH PROMOTING BACTERIA IN NITROGEN NUTRITION OF SUGARCANE

## ABSTRACT

Molybdenum (Mo) is an anionic micronutrient that plays a key role in enzymes such as nitrate reductase and nitrogenase responsible for the assimilation of NO<sub>3</sub> and biological nitrogen fixation (FBN), respectively. Nitrate reductase acts in the first step of reducing N-nitric and is fundamental in the assimilation of nitrogen. In another perspective, FBN performed by diazotrophic bacteria is considered the main natural way of entering N in agricultural systems and for this reason it is considered as a sustainable alternative to nitrogen fertilizers. However, the contributions obtained by inoculating bacteria are small and uncertain, and therefore, the mechanisms for promoting plant growth carried out by bacteria (BPCP) have been investigated in order to clarify and understand which ones are most active in the process. For this type of investigation, the analysis of proteins can guide the knowledge of these mechanisms, since they are directly linked to the formation of physiological characteristics that regulate phenotypes to adapt to certain changes. In view of the context, two studies were carried out: the first to evaluate the contribution of BPCP in conjunction with Mo fertilizer and associated with N in FBN in nitrogen nutrition and in the development of sugarcane and the second to identify the set of proteins that are potentially accumulated in response to the application of Mo, inoculation and N in sugarcane. In the first study, two cultivation cycles were carried out and plant growth parameters, activity of the nitrate reductase enzyme, FBN, nutrient contents and accumulations were evaluated. In the second study, plants with higher shoot biomass in the first study were subjected to extraction of total soluble proteins from leaf +1 and comparisons were made in four SDS-PAGE electrophoretic profiles for application or not of molybdic fertilizer when associated with inoculation of the inoculant ST, GHABH when combined or not with nitrogen fertilization. Our results showed that the micronutrient associated with the ST inoculant was more active in the process of N assimilation via NO<sub>3</sub><sup>-</sup> while in association with the GHABH inoculant it was more active in the FBN. However, the increase via FBN source was not sufficient to supply the crop's demand, since the fertilizer source contributed with most of the nitrogen nutrition. In this perspective, the ST bacterium associated with Mo showed the best results acting as a biostimulant and has potential for use as a new technological package associated with intermediate N doses, since they stimulate the best growth and development of the plant and the best use of the available N more efficient. Comparative proteomics found 46 sets of differential proteins, but only 28 were identified (60.86%). Inoculation acts mainly on the accumulation of proteins related to N absorption and metabolism, while the inoculation of BPCP associated with Mo acts on the accumulation of differential proteins related to sulfur metabolism, photosynthesis and hormonal mechanisms, especially with regard to auxins, abscisic acid and ethylene in the cultivation of sugarcane. Our research is based on an efficient and sustainable fertility management by applying a viable and economical input. These results not only deepen our understanding of the influence of Mo on the sugarcane proteome, but also provide new information on the molecular mechanism of culture regulated by Mo and by BPCP. Thus, this research is innovative, and makes it possible, in the short term, to identify sustainable alternatives, with reduced cost for sugarcane.

**Keywords:** Biological Nitrogen Fixation. Assimilation of N. Growth promotion. Plant hormones. Mass spectrometry. Sustainability.



## LISTA DE FIGURAS

### I. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

**Figura 01.** Representação esquemática da distribuição bacteriana e padrões de colonização por bactérias promotoras de crescimento de plantas na cana-de-açúcar. Bactérias rizosféricas (células rosa) colonizam a área do solo da rizosfera que apresentam maior influência de ácidos orgânicos. Bactérias epifíticas (células amarelas) interagem com a superfície da planta, podendo invadir os tecidos da planta. Bactérias endofíticas (células vermelhas) colonizam qualquer região da epiderme da raiz da planta e podem residir em espaços intercelulares, espaços apoplásticos e o vasos condutores da planta (xilema e floema), espalhando-se em órgãos vegetais distantes como colmo e folhas. As bactérias podem interagir de diferentes formas com a planta, representados por diferentes contornos coloridos. (Fonte: Elaborada pela autora). ...50

**Figura 02.** Mecanismos utilizados pelas BPCP na cultura da cana-de-açúcar para melhorar as interações na rizosfera, sobre a superfície vegetal, ou ainda, colonizando internamente os tecidos vegetais com influências diretas na fertilidade do solo, nutrição vegetal e estímulo hormonal, e/ou indiretas como tolerância à estresses bióticos e abióticos, indução de resistência à pragas e doenças e qualidade do solo. Caixas e setas azuis indicam mecanismos diretos de promoção de crescimento e caixas e setas vermelhas indicam mecanismos indiretos. Setas tracejadas indicam incremento. (Fonte: Elaborada pela autora)..... 52

**Figura 03.** Biossíntese do cofator de molibdênio. Os passos básicos da biossíntese de Moco são mostrados, começando da GTP (parte superior direita) a Moco, incluindo enzimas que catalisam cada respectiva etapa de biossíntese de Moco para plantas (verde), humanos (vermelho) e *E. coli* (preto) e são homólogos para as espécies. A estrutura de domínio dos monômeros da enzima Mo é dada na parte inferior da figura. As enzimas Mo ativas dependem não apenas da disponibilidade de Mo, mas também da presença dos dois metais ferro e cobre. (Fonte: Mendel, Schwarz 2011). ..... 59

**Figura 04.** Estruturas, funções e diagrama da enzima nitrogenase. As posições e estruturas relativas de duas moléculas de Mg-ATP ligadas, o cluster da proteína Fe [4Fe-4S], o cluster P da proteína MoFe (8Fe-7S) e o cofator FeMo (homocitrato 7Fe-Mo-9S-X) são mostrados. Cada um é destacado. O fluxo de elétrons é do cluster [4Fe-4S] para o cluster P e o cofator FeMo. (I) Codificado pelo gene *nifH*; (II) Codificado pelo gene *nifDK*. (Adaptado de: Foster et al., 2018). ..... 61

**Figura 05.** Estruturas, funções e diagrama da enzima redutase do nitrato (RN). As subunidades  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  mostradas em amarelo, azul e cinza são codificadas pelo (I) gene pelo NarI (II) gene pelo NarH (III) gene pelo NarG, respectivamente. As posições e estruturas relativas a Fe-Heme [4Fe4S] e complexo Moco são mostrados. Seta cinza para baixo indica o fluxo de elétrons. (Fonte: ANR, 2020)..... 63

**Figura 06.** Metabolismo do molibdênio em células vegetais superiores. Os principais componentes do metabolismo do molibdênio nas plantas são mostrados, incluindo a via

biossintética de Moco (proteínas CNX) na mitocôndria e no citosol, as enzimas do usuário Moco e suas respectivas funções principais na assimilação de nitrogênio (RN), síntese de ABA (AAO3), catabolismo de purina (XDH) e desintoxicação de sulfito (SO). As enzimas mARC são propostas para funcionar na redução de certos substratos N-hidroxilados, que ainda não foram identificados. Embora uma das duas isoformas de mARC (mARC2) contenha uma sequência de direcionamento mitocondrial NH<sub>2</sub>-terminal, tal sequência de direcionamento está ausente na segunda isoforma, que, portanto, é assumido que atua no citosol. Em contraste com o transportador de molibdato MOT2, que funciona na membrana vacuolar como um exportador de molibdato, o MOT1 pode se localizar no sistema de endomembrana, possivelmente para o retículo endoplasmático. A função da Moco sulfurase ABA3 na ativação de AO e XDH é indicada, assim como as funções do transportador ABC mitocondrial ATM3 na exportação de cPMP da mitocôndria e na montagem do cluster ferro-enxofre citosólico ([Fe-S]) para AO e XDH (e outras proteínas extra-mitocondriais). Molibdo-enzimas são indicadas por letras azuis, outros componentes do metabolismo do molibdênio por letras laranja; as setas pontilhadas indicam a necessidade de Moco por molibdo-enzimas. (Fonte: BITNNER, 2014).  
 ..... 65

**Figura 07.** Visão geral das diferentes técnicas multi-ômicas e genótipo-fenótipo utilizadas para análise de uma amostra complexa. Um fluxo de trabalho integrado típico é observado mais próximos do genótipo (genômica e transcriptoma) e aqueles mais próximo do fenótipo (proteômica e metabolômica), no qual os resultados podem ser caminhos simples ou redes complexas (indicado pela seta de cima para baixo) e podem incluir tanto moléculas conhecidas e novas. Para prever um resultado complexo, uma abordagem integrada a outros dados fisiológicos, bioquímicos devem ser utilizadas. (Fonte: Maroli et al., 2018).  
 ..... 69

## II. CAPÍTULO I

**Figura 01.** Mapa do Estado de Pernambuco, com destaque para o município de Vitória de Santo Antão e para o Instituto Federal de Pernambuco, com localização geográfica da casa de vegetação utilizada no experimento. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da base de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE e do Google Earth).  
 ..... 93

**Figura 02.** Dados meteorológicos do período do ensaio experimental realizado em estufa, na cidade de Vitória de Santo Antão – PE. (A) Temperatura média externa e temperatura máxima, média e mínima (°C) (B) umidade relativa do ar média externa e umidade relativa do ar máximo, médio e mínimo (%). (Fonte: Elaborada pela autora a partir da base de dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima – APAC e coleta de dados).  
 ..... 94

**Figura 03.** Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) para o substrato arenoso utilizado no experimento de cana-de-açúcar. Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados.)  
 ..... 102

**Figura 04.** Atividade da redutase do nitrato (ARN) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G:

*Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*..... 112

**Figura 05.** Teor de N foliar (TNF) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 114

**Figura 06.** Teor de N total (N total) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>). CT: Controle; N: Nitrogênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*..... 115

**Figura 07.** Teor de amônio (TNH<sub>4</sub><sup>+</sup>) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 117

**Figura 08.** Teor de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 119

**Figura 09.** Teor de Mo na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*..... 121

**Figura 10.** Abundância de átomos de <sup>15</sup>N na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*;

H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 124

**Figura 11.** Quantidade de Nitrogênio total (QNT) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 126

**Figura 12.** Porcentagem de nitrogênio derivado da fixação (Nddffix) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 128

**Figura 13.** Quantidade de Nitrogênio derivado da FBN (QNddffix) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 130

**Figura 14.** Porcentagem de nitrogênio derivado do solo (Ndfsolo) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 132

**Figura 15.** Quantidade de Nitrogênio derivado do solo (QNdfsolo) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 134

**Figura 16.** Produção de biomassa de parte aérea (BioPA) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na presença do

adubo molíbdico, inoculação de ST e dose de 1,96 g vaso<sup>-1</sup> de N; (B) Aplicação de 3,9 g vaso<sup>-1</sup> de N. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. .... 137

**Figura 17.** Biomassa de parte aérea (BioPA) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência de inoculação; (B e D) com inoculação da bactéria ST; (E e F) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. .... 138

**Figura 18.** Biomassa de parte aérea (BioPA) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência do adubo molíbdico; (C e D) na presença do adubo molíbdico. CT: Controle; N: Nitrogênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. .... 139

**Figura 19.** Altura de planta na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência de inoculação; (B e D) com inoculação da bactéria ST; (E e F) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. .... 141

**Figura 20.** Altura de planta na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência do adubo molíbdico; (C e D) na presença do adubo molíbdico. CT: Controle; N: Nitrogênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. .... 142

**Figura 21.** Diâmetro de colmo na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. .... 144

**Figura 22.** Produção de biomassa de raiz na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 200 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na presença do adubo molíbdico, inoculação de ST e dose de 2,94 g vaso<sup>-1</sup> de N; (B) Aplicação de 4,9 g vaso<sup>-1</sup> de N. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. .... 146

**Figura 23.** Biomassa de raiz na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 200 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do

adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ..... 147

### III. CAPÍTULO II

**Figura 01.** Mapa do Estado de Pernambuco, com destaque para o município de Vitória de Santo Antão e para o Instituto Federal de Pernambuco, com localização geográfica da casa de vegetação utilizada no experimento. (Fonte: Elaborado pelo autor a partir da base de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE e do Google Earth). ..... 171

**Figura 02.** Dados meteorológicos do período do ensaio experimental realizado em estufa, na cidade de Vitória de Santo Antão – PE. (A) Temperatura média externa e temperatura máxima, média e mínima (°C) (B) umidade relativa do ar média externa e umidade relativa do ar máximo, médio e mínimo (%). (Fonte: Elaborada pela autora a partir da base de dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima – APAC e coleta de dados). ..... 172

**Figura 03.** Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) para o substrato arenoso utilizado no experimento de cana-de-açúcar. Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados). ..... 181

**Figura 04.** Perfil eletroforético de extração de proteínas solúveis totais em SDS-PAGE de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 aos 100 dias após a germinação (A) com aplicação de Mo e inoculadas com bactérias ST (*Stenotrophomonas* sp.); (B) com aplicação de Mo e inoculadas com bactérias ST (*Stenotrophomonas* sp.); (B) com aplicação de N e Mo e inoculação com bactérias *Stenotrophomonas* sp. (C) com aplicação de Mo e inoculação de GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*). MM: Marcador de proteína de baixo peso molecular (Low marker- GE). Os pontos escuros indicam as bandas intensificadas, e os claros, as que diminuíram em consequência da adição do micronutriente e de inoculantes. (Fonte: Elaborada pela autora). ..... 187

**Figura 05.** Concentração de proteínas solúveis total e peso seco da folha +1 da cana-de-açúcar da variedade RB867515 aos 100 dias após a germinação. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp.; GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*). ..... 190

**Figura 06.** Bandas do gel SDS-PAGE da cana-de-açúcar da variedade de cana-de-açúcar RB867515, analisadas pelo software Gel Analyzer nos géis (A) Molibdênio + *Stenotrophomonas* sp. (B) Nitrogênio, + Molibdênio + *Stenotrophomonas* sp. (C) Molibdênio + GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*) (D)

Nitrogênio + Molibdênio + GHABH. Numerações e pesos moleculares foram utilizados para identificar bandas equivalentes..... 191

**Figura 07.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 01). MM: Marcador Molecular; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MS na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 195

**Figura 08.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 02). MM: Marcador Molecular; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MS na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 196

**Figura 09.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 03). MM: Marcador Molecular; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Nomenclatura G refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 197

**Figura 10.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 04). MM: Marcador Molecular; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Nomenclatura G refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 198

**Figura 11.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) inoculação de ST (B) aplicação de Mo e inoculação de ST (Comparação A). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas azuis funções das proteínas na planta. ST: *Stenotrophomonas* sp.; Mo: Molibdênio. .... 207

**Figura 12.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) a aplicação de N e inoculação de ST (B) aplicação de N e Mo e inoculação de ST (Comparação B). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas

azuis funções das proteínas na planta. O contorno vermelho indica que a proteína encontrada foi de bactéria. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. .... 210

**Figura 13.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) a inoculação de GHABH (B) aplicação de Mo e inoculação de GHABH (Comparação C). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas azuis funções das proteínas na planta. O contorno vermelho indica que a proteína encontrada foi de bactéria. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. .... 212

**Figura 14.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) a aplicação de N e inoculação de GHABH (B) aplicação de N e Mo e inoculação de GHABH (Comparação D). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas azuis funções das proteínas na planta. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. ... 214

## LISTA DE TABELAS

### I. CAPÍTULO I

**Tabela 01.** Caracterização química e física da areia lavada antes da incubação utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação.....96

**Tabela 02.** Caracterização da água utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação.. 97

**Tabela 03.** Análise de variância para redutase do nitrato (ARN) e teor de nitrogênio da parte aérea, nitrogênio foliar, molibdênio, amônio e nitrato (TN, TNF, TMo,  $\text{TNH}_4^+$  e  $\text{TNO}_3^-$ ) da parte aérea da cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada com e sem aplicação de molibdênio, com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vaso}^{-1}$ ). ..... 110

**Tabela 04.** Análise de variância para abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$ , quantidade de nitrogênio total, porcentagem de nitrogênio derivado da FBN, quantidade de nitrogênio derivado da FBN, porcentagem de nitrogênio derivado do solo e quantidade de nitrogênio derivado do solo ( $^{15}\text{N}$ , QNT, Ndffix, QNdff, Ndfsolo e QNdfs) para cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada com e sem aplicação de molibdênio, com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vaso}^{-1}$ ). ..... 122

**Tabela 05.** Análise de variância para biomassa de parte aérea, altura de planta, diâmetro de colmo e biomassa de raiz (Biopa, Alt, Dia e BioR) para cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada com e sem aplicação de molibdênio, com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 e 200 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vaso}^{-1}$ ). ..... 135

**Tabela 06.** Diâmetro de colmo de cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada sem e com Mo e bactérias promotoras de crescimento aos 100 DAG. .... 143

### II. CAPÍTULO II

**Tabela 01.** Fertilizantes e inoculantes utilizados como tratamentos para resposta da cana planta em casa de vegetação..... 174

**Tabela 02.** Caracterização química e física da areia lavada utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação..... 176

**Tabela 03.** Caracterização da água utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação. .... 177

**Tabela 04.** Descrição dos tratamentos utilizados na montagem do gel SDS-PAGE de cana-de-açúcar aos 100 DAG..... 184

**Tabela 05.** Tabela resumo de análise de variância para intensidade das bandas do perfil eletroforético de extração de proteínas solúveis totais em SDS-PAGE de cana-de-açúcar da variedade RB867515 com e sem aplicação de molibdênio e nitrogênio e com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 dias após a germinação. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 193

**Tabela 06.** Tabela resumo de análise de variância para intensidade das bandas do perfil eletroforético de extração de proteínas solúveis totais em SDS-PAGE de cana-de-açúcar da variedade RB867515 com e sem aplicação de molibdênio e nitrogênio e com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 dias após a germinação. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*). Nomenclatura G refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 194

**Tabela 07.** Identificação presumível das bandas de gel SDS-PAGE de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 submetidas a inoculação com a bactérias *Stenotrophomonas* sp. e aplicação do adubo molíbdico e nitrogenado. A - Inoculação versus inoculação com Mo; B – N e inoculação versus inoculação, Mo e N; S- sem Mo, MS- com Mo. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MS na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 201

**Tabela 08.** Identificação presumível das bandas de gel SDS-PAGE de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 submetidas a inoculação com a bactérias GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e aplicação do adubo molíbdico. A - Inoculação versus inoculação com aplicação de Mo; B – N e inoculação versus inoculação, Mo e N; S- sem Mo, MS- com Mo. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo..... 204

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%N <sub>d</sub> fix	Porcentagem de Nitrogênio derivado da fixação
%N <sub>d</sub> solo	Porcentagem de Nitrogênio derivado do solo
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol-3-acético
AMP	Adenilado de Pterina Tricíclica Molibdopterina
AO	Aldeído oxidase
ATM	Transportador de ligação de ATP das mitocôndrias
ATP	Trifosfato de adenosina
ATPase	Adenosinatrifosfatases do Trifosfato de Adenosina
Bac	Bactéria
BPCP	Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas
Cnx	Cofator para Redutase do Nitrato e Xantina Desidrogenase
COT	Carbono orgânico total
cPMP	Monofosfato de Piranopterina Cíclica
CT	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
FBN	Fixação biológica de Nitrogênio
GHABH	Conjunto de bactérias G: <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> ; H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ; A: <i>Nitrospirillum amazonense</i> ; B: <i>Burkholderia tropica</i> ; H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>
GOGAT	Glutamato sintetase
GS	Glutamina sintetase
GTP	Trifosfato de Guanosina
H <sup>+</sup>	Hídron
HClO <sub>4</sub>	Ácido perclórico
HCN	Ácido cianídrico
HCN	Cianeto de hidrogênio

Heme	Grupo prostético com ferro no centro de protoporfirina (anel heterocíclico)
KI	Iodeto de potássio
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potássio
mARC	Amidoxima redutase
MgO	Óxido de magnésio
Moco	Cofator de molibdênio
MOT1	Transportador de molibdênio
MPT	Pterina Tricíclica Molibdopterina
NAD(P)H	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Nar	Gene Nitrato redutase
NH <sub>3</sub>	Amônia
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amônio
NH <sub>4</sub> F	Fluoreto de amônio
NH <sub>4</sub> -N	Nitrogênio na forma de amoniacal
Nif	Nitrogen Fixation genes
NiR	Nitrito Redutase
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NO <sub>3</sub> -N	Nitrogênio na forma de nítrica
NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub>	Nitrato de amônio
PRNT	Poder Relativo de Neutralização Total
PST	Porcentagem de sódio trocável
PT	Porosidade total
QNdfsolo	Quantidade de Nitrogênio derivado do solo
QNT	Quantidade de Nitrogênio Total
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético
RN	Redutase do nitrato
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SO	Sulfito oxidase
ST	<i>Stenotrophomonas</i> sp.

TMo	Teor de molibdênio
TNF	Teor de Nitrogênio foliar
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UFV	Universidade Federal de Viçosa
XDH	Xantina oxidase/desidrogenase



## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{mol}$	Micromol
$^{15}\text{N}$	Isótopo estável de nitrogênio
$\text{Al}^{3+}$	Alumínio
B	Boro
C	Carbono
$\text{Ca}^{2+}$	Cálcio
CE	Condutividade elétrica
$\text{Cl}^-$	Cloro
cm	Centímetros
$\text{cm}^2$	Centímetros quadrados
$\text{cmol}_c$	Centimol de carga
$\text{CO}_2$	Dióxido de carbono
$\text{dm}^3$	Decímetro cúbico
Dp	Densidade de partículas
dS	Decisiemens
Ds	Densidade do solo
Fe	Ferro
g	Gramas
$\text{gMF}$	Gramas de massa fresca
h	Hora
ha	Hectare
Hz	Hertz
$\text{K}^+$	Potássio
kDa	Unidade de massa atômica kilodalton
kg	Quilo

km	Quilômetro
kV	Kilovolt
L	Litro
m	Metro
M	Molar
m	Porcentagem de Saturação por alumínio
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
mA	Miliampère
mesh	Abertura por polegada
Mg	Magnésio
Mg	Megagrama
mg	Miligrama
MJ	Megajoule
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	Milimolar
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
N	Nitrogênio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
°C	Graus celsius
P	Fósforo
P.A.	Para Análise (Alto grau de pureza)
pH	Potencial hidrogeniônico
pKa	Valor negativo do logaritmo da constante de dissociação de um ácido
ppm	Partes por milhão
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo
SB	Soma de bases

$\text{SO}_4^{2-}$	Sulfato
T	Capacidade de troca de cátions a pH 7,0
t	Capacidade de troca de cátions efetiva
UR	Umidade relativa
uT	Unidade de Turbidez
V	Porcentagem de Saturação por Bases da CTC a pH 7,0
V	Volts
xg	Unidades de gravidade
Zn	Zinco
$\theta_{cc}$	Capacidade de campo
$\theta_{pmp}$	Ponto de murcha permanente
$\Psi_m$	Potencial matricial



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL .....	43
1.1 Hipóteses .....	45
1.2 Objetivo Geral .....	45
1.3 Objetivos Específicos .....	45
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	46
2.1 A cultura da cana-de-açúcar .....	46
2.2 Avaliação econômica da cultura da cana-de-açúcar .....	47
2.3 Utilização de fertilizantes nitrogenados pela cultura da cana-de-açúcar .....	48
2.4 Bactérias promotoras de crescimento de plantas .....	49
2.5 Interações do molibdênio no solo e seu metabolismo na cultura da cana-de-açúcar .....	56
2.6 O molibdênio como potencializador do ciclo de nitrogênio .....	60
2.7 O molibdênio como potencializador de outras enzimas .....	64
2.8 Proteômica de cana-de-açúcar .....	68
REFERÊNCIAS .....	71
CAPÍTULO I .....	87
ASSIMILAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N NO DESENVOLVIMENTO E NUTRIÇÃO NITROGENADA DA CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADA COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E ADUBADAS COM MOLIBDÊNIO .....	87
RESUMO .....	88
ABSTRACT .....	89
2.1 Execução do experimento .....	92
2.1.1 Condução experimental .....	92
2.1.2 Correção do substrato .....	97
2.1.3 Enriquecimento do substrato com <sup>15</sup> n .....	97
2.1.4 Inoculação .....	98
2.1.5 Plantio da cana planta .....	100
2.1.6 Plantio das plantas referências .....	101
2.1.7 Controle da umidade e irrigação .....	101
2.1.8 Nutrição .....	102
2.2 Avaliações da cana planta .....	103

2.2.1 Análises biométricas da cana planta .....	103
2.3 Condução experimental da cana rebrota.....	103
2.3.1 Reinoculação da cana rebrota .....	104
2.3.2 Análises biométricas da cana rebrota .....	104
2.4 Análises laboratoriais da cana planta.....	105
2.4.1 Atividade da enzima redutase do nitrato .....	105
2.4.2 Teor de nitrogênio total .....	105
2.4.3 Teor de amônio e nitrato.....	106
2.4.4 Teor de molibdênio.....	106
2.4.5 Estimativa da fixação biológica do N <sub>2</sub> .....	107
2.4.6 Teor de nitrogênio foliar.....	109
2.5 Análises estatísticas .....	109
3 RESULTADOS.....	110
3.1 Metabolismo e nutrição .....	110
3.1.1 Atividade da enzima redutase do nitrato .....	110
3.1.2 Teor de nitrogênio foliar.....	113
3.1.3 Teor de nitrogênio total .....	115
3.1.4 Teor de amônio.....	116
3.1.5 Teor de nitrato .....	118
3.1.6 Teor de molibdênio total .....	120
3.2.1 Abundância de átomos de <sup>15</sup> N .....	122
3.2.2 Quantidade de nitrogênio acumulado .....	125
3.2.3 Nitrogênio derivado da fixação .....	127
3.2.4 Quantidade de nitrogênio derivado da fixação .....	129
3.2.5 Nitrogênio derivado do solo .....	131
3.2.6 Quantidade de nitrogênio derivado do solo.....	133
3.3 Biometria .....	135
3.3.1 Biomassa de parte aérea .....	135
3.3.2 Altura .....	140
3.3.3 Diâmetro .....	143
4 DISCUSSÕES.....	148
5 CONCLUSÕES.....	153
REFERÊNCIAS .....	154

CAPÍTULO II.....	165
ANÁLISE DO PROTEMA DIFERENCIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR RELACIONADA À APLICAÇÃO DE ADUBO MOLIBDÍDICO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS .....	165
RESUMO .....	166
ABSTRACT .....	167
1 INTRODUÇÃO.....	168
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	171
2.1 Execução do experimento.....	171
2.1.1 Condução experimental .....	171
2.1.2 Correção do substrato .....	177
2.1.3 Enriquecimento do solo com <sup>15</sup> N .....	177
2.1.4 Inoculação.....	178
2.1.5 Plantio da cana planta .....	180
2.1.6 Controle da umidade e irrigação.....	181
2.1.7 Nutrição .....	182
2.2 Análises laboratoriais .....	182
2.2.1 Coleta do material.....	182
2.2.2 Extração de proteínas.....	183
2.2.3 Eletroforese unidimensional .....	185
2.2.4 Digitalização, análise de imagens e seleção de bandas diferenciais.....	186
2.2.5 Digestão e identificação de proteínas por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF) .....	188
2.2.6 Identificação presumível das proteínas .....	189
2.2.7 Ontologia gênica (GO) .....	189
3 RESULTADOS.....	190
4 DISCUSSÕES.....	206
5 CONCLUSÕES.....	215
REFERÊNCIAS .....	216
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	231



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e ocupa importante posição no cenário de exportação agrícola mundial, no qual é considerado o maior produtor e exportador de açúcar e etanol derivado da cana. Por isso, a cana-de-açúcar destaca o país no mercado internacional e apresenta importância social, econômica e política para o país.

As vantagens competitivas de mercado que a cana-de-açúcar representa, tanto no cenário nacional quanto internacional, inserem o Brasil como importante competidor no setor de biocombustíveis. Contudo, parte significativa dos insumos agrícolas utilizados no país para o cultivo da cultura é dependente de matéria prima fertilizante, especialmente no que diz respeito aos fertilizantes nitrogenados, que apresentam alto custo e baixo aproveitamento via adubação, o que são considerados fatores limitantes à produtividade e rendimento dos canaviais Brasileiros. Portanto, técnicas que visem disponibilizar o nutriente e aumentar a produtividade de forma sustentável, com consequente redução dos custos de produção tornam-se importantes para a produção e representatividade da cultura.

Entre as fontes de nitrogênio para a planta, além dos fertilizantes nitrogenados, destacam-se a mineralização da matéria orgânica e a Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas que podem se associar à cana-de-açúcar e disponibilizar parte do N total adquirido pela planta por meio da enzima nitrogenase.

Como o molibdênio (Mo) apresenta papel central na enzima nitrogenase, enzima responsável redução do  $N_2$  a amônio ( $NH_4^+$ ) o micronutriente é indicado como um potencializador desse processo. O Mo também apresenta papel importante na redutase do nitrato (RN), enzima responsável pela assimilação de N via nitrato ( $NO_3^-$ ), e por este motivo, pode influenciar a disponibilidade de N na planta. Portanto, em hipótese, a deficiência do Mo implicará em menor atividade das enzimas nitrogenase e RN com consequente redução do processo simbiótico e da assimilação de N na planta.

O processo de FBN é a contribuição das bactérias mais estudada, mas ainda são relatados outros mecanismos de promoção de crescimento pelas bactérias diazotróficas que incluem a solubilização de fosfatos inorgânico, a biossíntese de fito-hormônios, a fitoestimulação da redução do etileno (ACC deaminase), produção de sideróforos (quelantes de ferro), controle biológico, antagonismo aos organismos fitopatogênicos, indução de resistência à doenças, resistência à déficits hídricos, metais pesados e a salinidade.

Alguns destes mecanismos de auxílio ao desenvolvimento da planta também são mediados por enzimas que apresentam o Mo no seu centro ativo. Como, por exemplo, a enzima

aldeído oxidase/reductase que catalisa os passos finais da produção de hormônios vegetais como o ácido indol-3-acético e o ácido abscísico, ambos responsáveis pelo desenvolvimento e arquitetura de raízes e alongamento de pelos radiculares. Além dessa, o Mo atua em outras enzimas que são relacionadas à melhoria da resposta de estresses bióticos e abióticos. Como enzimas que apresentam o Mo em seu centro ativo com a função de transporte de elétrons podemos citar a que catalisa reações do catabolismo da purina (xantina desidrogenase/oxidase), a ligada ao metabolismo do enxofre (sulfito oxidase), e a responsável pela ativação e desintoxicação de aminas aromáticas e heterocíclicas (amidoxima reductase) que apresentam função chave de um processo essencial para a planta ou participa de uma importante via metabólica e qualquer fator que possa interferir e comprometer a biossíntese Moco nestas enzimas resulta no comprometimento de sua atividade, e por consequência a inviabilidade do processo, o que pode resultar em problemas para a cultura.

Portanto, como o Mo apresenta baixa disponibilidade no solo devido às suas interações, utilização e extração sem a devida reposição, podemos considerar que os mecanismos de manutenção do nutriente no sistema é baixo, o que implica na deficiência deste para as plantas. Por este motivo, aplicar o Mo é essencial para a manutenção de maiores produtividades na cana-de-açúcar.

Além disso, quando o Mo é associado a veículos inoculantes, o produto apresenta baixo custo de aplicação, e potencial aplicação na agricultura de forma sustentável, uma vez que pode reduzir as doses de fertilizantes nitrogenados que apresentam problemas ambientais.

Neste contexto, como o Mo é fundamental nos grupos prostéticos por participar da estrutura e atuar na síntese e ativação de enzimas ligadas ao desenvolvimento da planta e às bactérias diazotróficas promotoras de crescimento de plantas (BPCP), a compreensão dos mecanismos proteicos que são reguladores da associação e estímulo da aplicação de Mo pode orientar o conhecimento das funções determinantes do micronutriente para adaptação e melhorar a associação na cana-de-açúcar, uma vez que as alterações podem ser percebidas na planta e no microbionte e a combinação com a análise proteômica pode ser uma visão holística do processo de associação de microrganismos, Mo e a cana-de-açúcar.

### **1.1 Hipóteses**

- A utilização do adubo molíbdico associado à inoculação de BPCP endofítica proporciona maior atividade da enzima nitrogenase nas bactérias diazotróficas e aumenta a entrada de nitrogênio via FBN na cana-de-açúcar;
- A inoculação de BPCP endofítica em conjunto ao adubo molíbdico eleva a atividade da redutase do nitrato na cana-de-açúcar o que potencializa a assimilação de N via nitrato e favorece o maior aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados;
- O molibdênio em conjunto com as BPCP endofítica estimula a produção de hormônios vegetais proporcionando melhor desenvolvimento da raiz e da parte aérea na cultura da cana-de-açúcar;
- O micronutriente Mo na adubação associado a BPCP endofítica modifica o proteoma da cana-de-açúcar e o metabolismo do nitrogênio.

### **1.2 Objetivo Geral**

Avaliar o potencial das bactérias promotoras de crescimento em conjunto com adubação molíbdica de auxiliar o desenvolvimento da cana-de-açúcar e da nutrição nitrogenada.

### **1.3 Objetivos Específicos**

- Quantificar a contribuição da FBN na cana-de-açúcar quando utilizada a adubação molíbdica associado às BPCP;
- Analisar o incremento proporcionado pela aplicação do Mo e inoculação de BPCP na assimilação do N por meio da atividade da ARN na cana-de-açúcar;
- Avaliar a eficiência das BPCP em conjunto com adubação molíbdica no crescimento e na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar;
- Identificar o conjunto de proteínas potencialmente acumuladas em resposta à inoculação e aplicação de adubo molíbdico na nutrição nitrogenada em folha de cana-de-açúcar.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 A cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma espécie de poaceae, nativa das regiões tropicais do sul da Ásia e da Melanésia, no qual foi domesticada e disseminada por toda a região. É cultivada desde a antiguidade e foi estabelecida como cultura agrícola de importância econômica à 2500 a.C. (DANIELS; ROACH 1987; RIDESA, 2015).

A cultura foi descrita pela primeira vez por Linnaeus em 1753 no livro “Species Plantarum” com duas espécies, mas a sua classificação taxonômica atual a descreve no domínio Eukarya, família Poaceae, sub-família Panicoideae, tribo Andropogoneae, Subtribo Saccharinae, grupo Saccharastrae e gênero Saccharum que apresenta seis espécies: *S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. sinense*, *S. barberi* e *S. edule* (DANIELS; ROACH, 1987; HITCHCOCK, 1923; NCBI, 2020). A mesma família taxonômica comporta outras culturas de importância econômica como trigo, arroz, aveia, bambu, milho, sorgo, centeio, cevada, dentre outros.

Em 1493, Cristóvão Colombo introduziu o primeiro plantio de cana na América Central, na cidade de Santo Domingo, na República Dominicana. A cultura chegou ao Brasil no ano de 1532, oficialmente trazida pelo militar Martim Afonso de Souza à capitania São Vicente. No país, o clima tropical e os tipos de solo favoreceram o desenvolvimento da planta e a produção Brasil (LE COUTEUR; BURRESON, 2006; MARIN; NASSIF, 2013), com isso no século XVII, o país já era considerado o maior produtor mundial de açúcar passando a monopolizar o produto (DIAS et al., 2015). Ainda, a história econômica brasileira ocorreu simultaneamente ao desenvolvimento da cultura no país, por isso, a cana-de-açúcar apresenta importante papel na formação econômica, política e social do país.

A cultura da cana-de-açúcar apresenta ciclo de vida relativo e perene na sua forma natural e semiperene na sua forma cultivada, por exigir novos plantios após algumas colheitas (GÓMEZ-MERINO et al., 2014). É uma cultura que apresenta perfilhamento abundante, são de grande porte e sempre fazem touceiras. É uma planta de metabolismo C4, e por isso apresenta alta taxa fotossintética em torno de  $1.054 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  e alta troca líquida de carbono em torno de  $-1964 \pm 44 \text{ g C m}^{-2}$ , o que lhe confere baixas emissões de gases de efeito estufa (CABRAL et al., 2013).

Atualmente, as variedades de cana-de-açúcar são híbridos originados de cruzamentos interespecíficos plantas de *S. officinarum* e *S. spontaneum* e aproximadamente 66% dos canaviais brasileiros são cultivados com variedades da Rede Interuniversitária para o

Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro – RIDESA, que ocupa 5,6 milhões de hectares (MORAIS et al., 2015; RIDESA, 2019). Destes, as cultivares líderes são a RB867515, a RB966928, e a RB92579 com 25% 12% e 10% de área cultivada no Brasil, respectivamente (RIDESA, 2019).

No estado de Pernambuco a variedade RB867515 também apresenta números favoráveis sendo a mais plantada no inverno com 25,45% de área cultivada enquanto que no plantio de verão representa apenas 11,30% dos cultivos, perdendo para a variedade RB92579, que ocupa o ranking de 29,33% (RIDESA, 2019).

A variedade RB867515 resultou de um policruzamento, tendo como variedade progenitora a RB72454 e foi lançada pela Universidade Federal de Viçosa (UFV). Possui alta performance produtiva, alto teor de sacarose, além de ter excelente desenvolvimento e desempenho em solos de textura arenosa e de fertilidade média (RIDESA, 2015).

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

A demanda global por alimentos e bioenergia é impulsionada pelo crescimento populacional, o que influencia diretamente na agricultura. Dessa forma, o agronegócio ocupa uma importante posição no Brasil representando 42,4% da balança comercial com 96,79 milhões de dólares (MAPA, 2020). Dentre os produtos agrícolas exportados, o complexo sucroalcooleiro é o quarto mais importante com participação de 6,46% das exportações brasileiras (MAPA, 2020).

O Brasil é considerado o principal produtor mundial de cana-de-açúcar e contribui com cerca de 40,4% de toda produção mundial da cultura (FAOSTAT, 2016). Com produção de 642,7 milhões de toneladas o país tem produtividade média de 75,78 Mg ha<sup>-1</sup> com 8.481,2 milhões de hectares plantados, o que representa um aumento de 3,6% em relação à safra 2018/2019. (CONAB, 2019a). Os subprodutos da cana-de-açúcar apresentam participação de 3,4% das exportações brasileiras (MDIC, 2020).

Os bons números e o aprimoramento tecnológico permitem que o país seja o maior produtor e exportador mundial de açúcar e etanol derivado da cana-de-açúcar e que compartilhe com os EUA, maior produtor de etanol mundial e derivado do milho, a posição de maiores produtores de etanol (USDA, 2019). Os dois países são responsáveis por 85% de todo o produto combustível comercializado no mundo. O Brasil é autossuficiente no consumo de etanol chegando a exportar em torno de 43% da produção para outros países, inclusive os EUA, que consomem cerca de 26% da produção brasileira (USDA 2019).

Essa posição do país em função do comércio do etanol é importante uma vez que há um

papel ambiental do produto no setor dos biocombustíveis. O produto é considerado uma alternativa à gasolina com capacidade de reduzir em 80% a emissão de gases de efeito estufa (WANG et al., 2014).

A evolução do setor sucroenergético proporcionará aumentos significativos na produção e produtividade dos canaviais brasileiros. No Nordeste, espera-se um incremento de 10,5% na produtividade da cultura em relação à safra anterior (CONAB, 2019a). As perspectivas ainda mostram que na safra 2019/2020 deverá haver aumento de 4,6% na produção de etanol e de 10,4% na produção de açúcar da região. Para a produção brasileira, as estimativas são de crescimento de 4,2% de 2019-2029.

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

A cana-de-açúcar apresenta vantagens competitivas de mercado, tanto no cenário nacional quanto internacional, mas o Brasil é dependente da matéria-prima fertilizante para o cultivo. Em 2018, o volume de importação de fertilizantes no Brasil foi de 24,96 milhões de toneladas, o que totalizou aumento de 4% em relação ao ano de 2017 (ANDA, 2019).

A demanda mundial está em torno de 182 milhões de toneladas, no qual o Nitrogênio (N) é o nutriente mais consumido na produção agrícola, sendo 60% deste total (SNA, 2018). O Brasil, é o quarto país com maior consumo destes fertilizantes, com aproximadamente 35,5 milhões de toneladas, perdendo apenas para a China, Índia e Estados Unidos (ANDA, 2019). Segundo o SIACESP (2019), o Brasil importou 15% dos fertilizantes comercializados no mundo em 2018.

Em adição a este cenário, o país é considerado o terceiro maior importador de fertilizantes nitrogenados, dos quais foram responsáveis por 35% das importações brasileiras, o que, em relação à safra anterior, representa um aumento de 1% (ANDA, 2019). Desses, 62% foram na forma de ureia, 26% na forma de sulfato de amônio e 12% na forma de nitrato de amônio, o que totalizou 8,7 milhões de toneladas com origem principalmente da Rússia, China e Argélia (GLOBALFERT, 2019).

Neste panorama favorável ao consumo de fertilizantes que o Brasil apresenta o custo de produção alto e o baixo aproveitamento dos N aplicados via adubação (VIEIRA-MEGDA et al., 2015) que eleva a emissão de gases de efeito estufa (HEIL; VEREECKEN; BRÜGGEMANN, 2015) são considerados fatores limitantes à produtividade e rendimento dos canaviais Brasileiros. Além disso, na cana planta, a utilização do N proveniente do fertilizante

aplicado varia de 40 a 10%, enquanto que na cana soca de 70 a 30%, entre o início e final do ciclo de crescimento (FRANCO et al., 2011).

No trabalho de Vieira-Megda et al. (2015) que utiliza diferentes fontes de N em campo, como o sulfato de amônio, cloreto de amônio e ureia em dose de 100 kg ha<sup>-1</sup> foi observado que nos estágios iniciais da cultura, o fertilizante possui papel importante e sua porcentagem de aproveitamento de N fertilizante é de 60% no início do desenvolvimento, mas que a assimilação do nutriente nos estágios de maturação é reduzido chegando a 20% próximo ao estágio de colheita, independente da fonte utilizada. Estes resultados levantam questões sobre a eficiência de utilização dos adubos, bem como tornam interessantes técnicas que disponibilizem o nutriente e aumente a produtividade da cultura com sustentabilidade e consequente redução dos custos de produção.

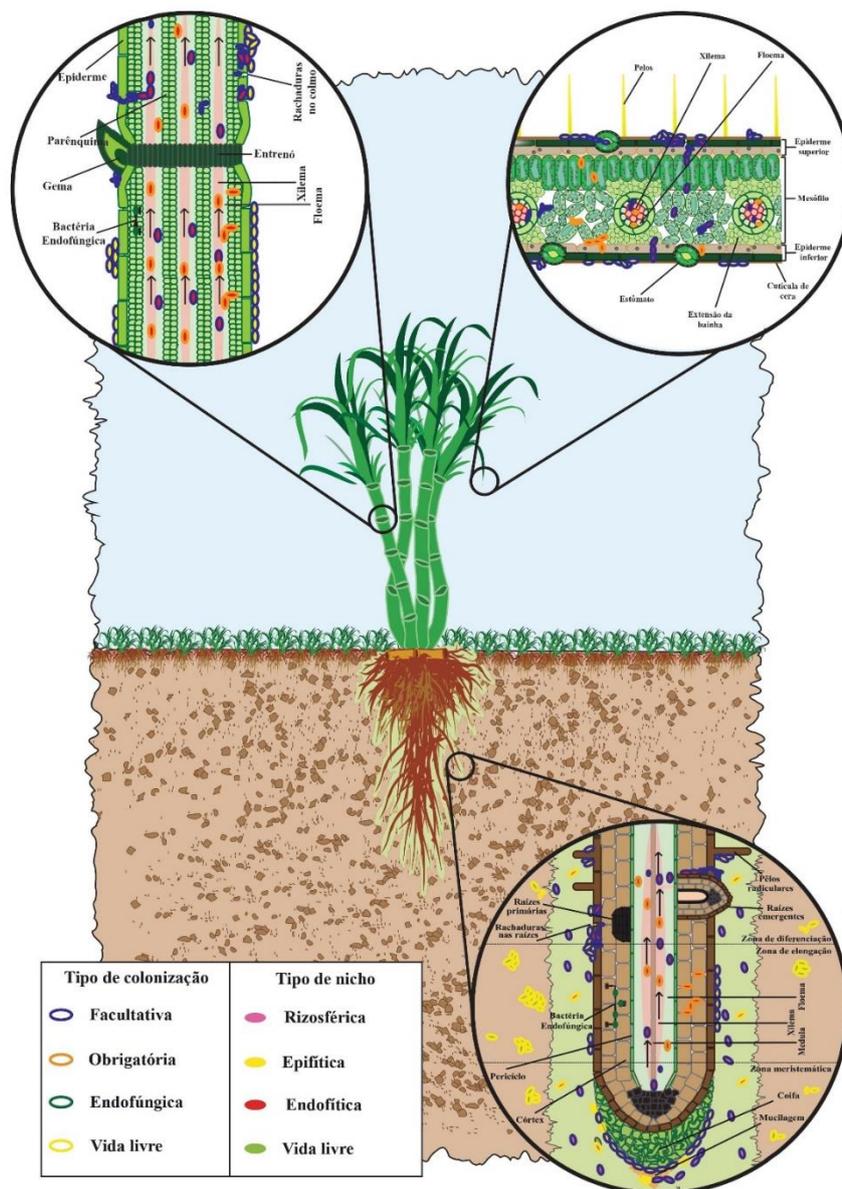
Ainda, esta baixa eficiência revela que, a cultura da cana-de-açúcar obtém N de outras fontes, uma vez que o nutriente é responsável pela brotação e perfilhamento (SALEEM, 2012), possui papel essencial no desenvolvimento e produtividade (BELL; WOOD; MOODY, 2014) e sem N a planta restringe em 92% o acúmulo de matéria seca, 91% o crescimento da planta e em 83% o crescimento das raízes (VALE et al., 2011). Dentre essas 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 (BARTH et al., 2018) e a Fixação Biológica de N atmosférico (FBN) por organismos diazotróficos promotores de crescimento de plantas capazes de formar associações por meio de associações rizosféricas e dos tecidos internos da planta, estabelecendo associações endofíticas (ROPER; GUPTA, 2016).

Neste sentido, estudos relacionados ao nutriente N que avaliem estas fontes alternativas aos fertilizantes e que almejem elevar a produtividade e longevidade dos canaviais de forma sustentável e com menor custo são foco das pesquisas atuais, de modo a suprir as necessidades e exigências da planta, que são estimadas em 160 e 182 kg ha<sup>-1</sup> (TRIVELIN et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016) para cana planta e soca, respectivamente.

## **2.4 Bactérias promotoras de crescimento de plantas**

As Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP) têm despertado interesse no agronegócio, principalmente em culturas de importância econômica, como a cana-de-açúcar. Estas são definidas como um grupo heterogêneo de procariotos que podem ser de vida livre ou estabelecer associações. Essas associações podem se caracterizar por colonizar diferentes regiões onde existem interação de componentes bióticos e abióticos, como a rizosfera das plantas (rizosféricas), o caule da parte aérea (caulosfera), a superfície das folhas (filosfera),

dentre outras partes da planta. Também pode habitar sobre a superfície dos órgãos e tecidos vegetais (epifítico), ou ainda, colonizar internamente os tecidos vegetais sem causar aparente dano ou doenças a seus hospedeiros (endofíticos) (Figura 01) (FAN et al., 2011; WEI et al., 2014; SANTOYO et al., 2016; TAULÉ et al., 2016).



**Figura 01.** Representação esquemática da distribuição bacteriana e padrões de colonização por bactérias promotoras de crescimento de plantas na cana-de-açúcar. Bactérias rizosféricas (células rosa) colonizam a área do solo da rizosfera que apresentam maior influência de ácidos orgânicos. Bactérias epifíticas (células amarelas) interagem com a superfície da planta, podendo invadir os tecidos da planta. Bactérias endofíticas (células vermelhas) colonizam qualquer região da epiderme da raiz da planta e podem residir em espaços intercelulares, espaços apoplásticos e o vasos condutores da planta (xilema e floema), espalhando-se em órgãos vegetais distantes como colmo e folhas. As bactérias podem interagir de diferentes formas com a planta, representados por diferentes contornos coloridos. (Fonte: Elaborada pela autora).

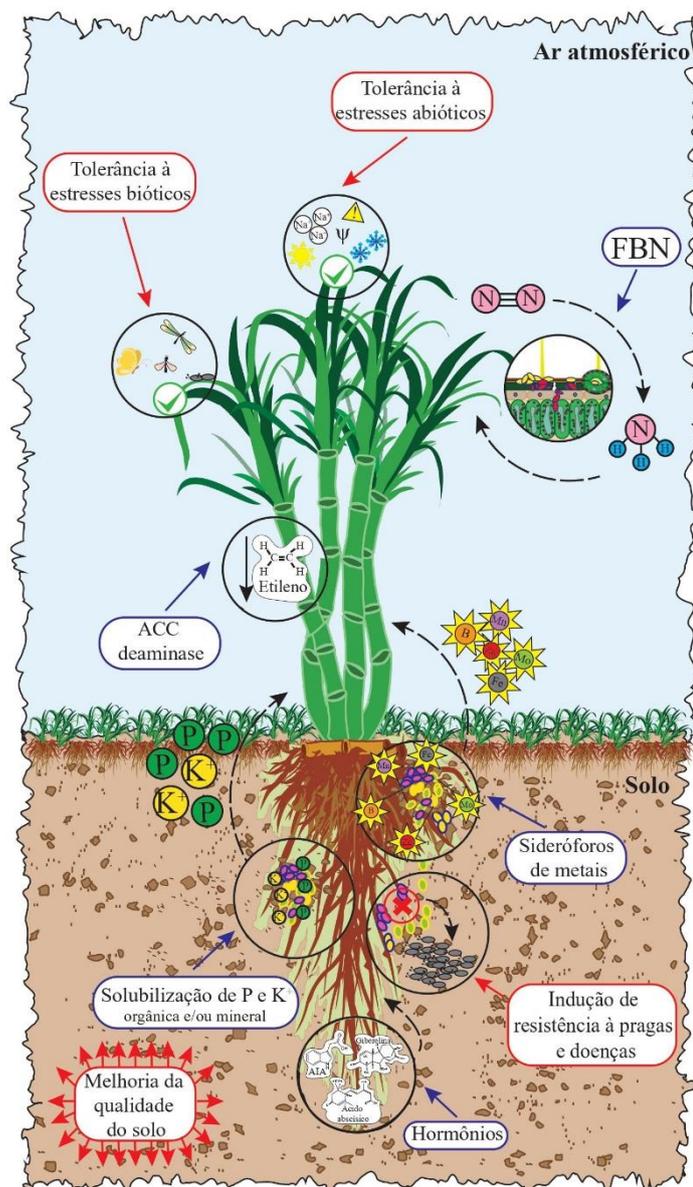
Estes organismos podem migrar da rizosfera para caulosfera e/ou filosfera (WEI et al., 2014), de forma que, na cultura da cana-de-açúcar por exemplo, o microbioma rizosférico apresenta maior diversidade microbiana e menor abundância, enquanto que, a filosfera menor diversidade e maior abundância (ARMANHI et al., 2018).

A associação de bactéria com as plantas também pode ser classificada de acordo com os diferentes tipos de colonização das bactérias, podendo ser classificadas como bactérias obrigatórias, quando estes são estritamente dependentes da planta hospedeira para o seu crescimento, sobrevivência e transmissão; bactérias facultativas quando estas tem um estágio de vida ou ciclo em que vivem em ambientes externos sem associação à planta; e bactérias endofúngicas quando colonizam as plantas de forma semelhante ao hospedeiro fungico (Figura 01) (HARDOIM et al., 2008; LACKNER; PARTIDA-MARTINEZ; HERTWECK, 2009; LIU et al., 2017).

Nas plantas, os BPCP podem infectar o hospedeiro por meio de raízes laterais emergentes, rachaduras e cicatrizes de raízes, caules e folhas, pelos radiculares e zonas meristemáticas, no qual, atingem o córtex, colonizam células intracelular e extracelularmente e atingem os tecidos condutores do floema e xilema, assim, conseguem ser conduzidas pela transpiração da planta até tecidos mais distantes e distribuídos (LIU et al., 2017). Posteriormente, podem ser transmitidas de geração em geração através de sementes, propagação vegetativa, plantas mortas, folhas, e, possivelmente, por insetos (SANTOYO et al., 2016).

Os diferentes padrões de colonização e infecção dessas bactérias podem ser correlacionados aos seus padrões de interação com a planta, uma vez que a depender das necessidades da cultura e das contribuições que esses microrganismos podem oferecer, a associação torna-se vantajosa e pode ser estabelecida com sucesso entre bactéria-hospedeiro.

As contribuições para o crescimento e desenvolvimento das culturas por essas BPCP podem ocorrer de forma direta e/ou indireta (Figura 02). Como influências diretas podemos indicar aqueles que influenciam na fertilidade e nutrição das plantas: como a FBN (ROSENBLUETH et al., 2018), a solubilização de P (KALAYU, 2019) e K (ETESAMI; EMAMI; ALIKHANI, 2017), a produção de sideróforos (Fe, Mn, Mo, Zn e B) (JOHNSTONE; NOLAN, 2015); e os que influenciam no estímulo hormonal: como a produção de auxinas (KUNKEL; HARPER, 2018), citocininas, giberelinas, ácido abscísico (KUDOYAROVA; ARKHIPOVA; MELENĚEV, 2015) e redução de etileno (ACC deaminase) (PREMACHANDRA; HUDEK; BRAU, 2016).



**Figura 02.** Mecanismos utilizados pelas BPCP na cultura da cana-de-açúcar para melhorar as interações na rizosfera, sobre a superfície vegetal, ou ainda, colonizando internamente os tecidos vegetais com influências diretas na fertilidade do solo, nutrição vegetal e estímulo hormonal, e/ou indiretas como tolerância à estresses bióticos e abióticos, indução de resistência à pragas e doenças e qualidade do solo. Caixas e setas azuis indicam mecanismos diretos de promoção de crescimento e caixas e setas vermelhas indicam mecanismos indiretos. Setas tracejadas indicam incremento. (Fonte: Elaborada pela autora)

Como influências indiretas podemos mencionar os que influenciam a tolerância à estresses bióticos e abióticos (KAVAMURA et al., 2012; MAJEED; MUHAMMAD; AHMAD, 2018; NUMAN et al., 2018); a indução de resistência à pragas e doenças: como produção de antibióticos, produção de metabólitos fungicos, cianeto de hidrogênio – HCN, indução de resistência sistêmica e enzimas líticas (GLICK, 2012; DUTTA et al., 2014; LUDWIG-MÜLLER, 2015; PREMACHANDRA; HUDEK; BRAU, 2016); e os que influenciam na melhoria da qualidade do solo (MAJEED; MUHAMMAD; AHMAD, 2018).

Na cultura da cana-de-açúcar, alguns desses mecanismos têm sido estudados, principalmente nas regiões tropicais, com o intuito de esclarecer quais mecanismos estariam contribuindo mais intimamente com o crescimento e desenvolvimento da planta, em virtude do número de espécies bacterianas encontradas associadas à cultura (ANTUNES et al., 2017) e identificadas como BPCP (SILVEIRA et al., 2019) que aumentou consideravelmente nos últimos anos devido ao desenvolvimento de ferramentas moleculares (CHAUHAN et al., 2015).

Das contribuições diretas apresentadas, a FBN é indiscutivelmente o mecanismo mais estudado na cultura atualmente, mas o aporte de N nas gramíneas, principalmente no que diz respeito a cana-de-açúcar, é considerado pequeno quando comparado à família das leguminosas.

Trabalhos recentes mostram que a contribuição das bactérias diazotróficas em cultivares de cana-de-açúcar brasileiras é de aproximadamente 30-50% (SANTOS et al., 2018; ANTUNES et al., 2019) o que equivale a 40 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N e representa 20% do N total assimilado pela planta (URQUIAGA et al., 2012).

Quando comparado às leguminosas, esses valores são considerados baixo, uma vez que na cultura da soja, por exemplo, a contribuição das bactérias diazotróficas é de aproximadamente 70-90% o que equivale em média a 422 kg ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> de N para leguminosas forrageiras (CARLSSON; HUSS-DANEL, 2003) e 200 kg ha ano<sup>-1</sup> para plantas cultivadas (GILLER, 2001; MAPA, 2007), e representa 80% do N total assimilado pela planta e uma economia de 33,1 milhões no ano de 2019 (CONAB, 2019b), pois o custo de aplicação do fertilizante é de R\$ 8,00 por hectare (EMBRAPA, 2020; CONAB, 2019b). Esse custo quando comparado à aplicação do N-fertilizante, são considerados irrisórios.

Além disso, a FBN em plantas não leguminosas apresenta resultados variáveis e pouco consistentes, e por isso, há limitações no uso de inoculantes no campo. Contudo, algumas pesquisas como Silva (2016) e Oliver e Silva (2018) já apontam que na cana-de-açúcar é possível reduzir de forma significativa o uso fertilizante nitrogenado quando se utiliza um inoculante adequado, principalmente quando associado à novas tecnologias, o que aumenta o aproveitamento do fertilizante e reflete em menor custo de produção e uma produção mais sustentável.

O processo de FBN é rigorosamente regulado pela demanda e disponibilidade de N, e por isso, condições limitadoras do fertilizante nitrogenado vão reduzir os níveis de glutamina na planta e estimular a associação com microrganismos diazotróficos (BATISTA; DIXON, 2019). Ainda assim, Gírio et al. (2015) observaram que na cultivar RB867515 a inoculação associada ao fornecimento de N em doses baixas aumenta a velocidade de brotação, o acúmulo de matéria seca das raízes e da parte aérea, altura e diâmetro até os 180 dias.

Da mesma forma, na pesquisa de Oliver e Silva (2018), quando o inoculante foi combinado a doses de 60 e 90 kg ha<sup>-1</sup> de N a associação promoveu incremento no acúmulo de matéria seca, e maior eficiência e aproveitamento do fertilizante nitrogenado. Por outro lado, no mesmo estudo, os resultados encontrados com uma dose muito elevada de N, como a de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N promoveu redução de todos os parâmetros de crescimento da planta.

Em grande parte das pesquisas, quando realizada a inoculação com as BPCP é possível observar vantagens no desenvolvimento da parte aérea e raiz da cana-de-açúcar, o que resulta em maior produtividade. Contudo, nem sempre há uma correlação direta com maior acúmulo de N na planta o que implicaria em maior eficiência do processo de FBN realizado pelas bactérias associativas.

Em pesquisa de casa de vegetação e solo enriquecido com <sup>15</sup>N, Santos et al. (2019) avaliaram o crescimento, a assimilação de nutrientes e a contribuição da FBN em duas cultivares de cana-de-açúcar, RB867515 e IACSP95-5000, inoculadas com *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Nitrospirillum amazonense* e *Paraburkholderia tropica*, aplicadas em conjunto e individualmente, por 60 dias. Os pesquisadores observaram incrementos de até 50% na biomassa de raiz das mudas após a inoculação mista na fase de germinação, com um aumento significativo no volume e na área das raízes, especialmente nas raízes finas. Também foram observados incrementos significativos na biomassa de parte aérea no início do desenvolvimento da cultura, mas os resultados não tiveram ligação com a contribuição da FBN.

Em outra pesquisa já realizada em campo, com o objetivo de avaliar a contribuição da inoculação de um mix de BPCP composto por *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia tropica* e *Azospirillum amazonense*, aplicadas individualmente e em mistura em seis variedades comerciais de cana-de-açúcar, Pereira et al. (2013a) observaram incremento semelhante à adubação nitrogenada para o número de colmos e para o acúmulo de matéria seca em todas as variedades avaliadas e inoculadas. Os autores evidenciaram que, dentre as variedades estudadas, a RB867515 se destacou nos parâmetros avaliados, mas como não houve relação direta entre o acúmulo de N e o acúmulo de biomassa seca nessa variedade, o efeito obtido foi atribuído a outras contribuições de promoção de crescimento.

Esses incrementos de biomassa de parte aérea e raiz encontrados e não correlacionados à FBN na cana-de-açúcar, em geral, são correlacionados aos demais mecanismos de promoção de crescimento. Contudo, nos estudos realizados a partir da associação BPCP e cana-de-açúcar não são apontados quais mecanismos estariam auxiliando e contribuindo efetivamente com o crescimento e desenvolvimento da planta, uma vez que todas as avaliações de possíveis

contribuições da bactéria são realizadas em pesquisas de laboratório que apresentam situações controladas e ensaios aplicados apenas às BPCP sem associação com a planta.

Neste sentido, na tentativa de identificar quais seriam as possíveis contribuições de promoção de crescimento que as BPCP associadas a variedades de cana-de-açúcar uruguaias poderiam proporcionar à cultura, Taulé et al. (2012) isolaram bactérias do colmo das variedades da cana-de-açúcar, identificaram e caracterizaram esses organismos. Na pesquisa, foram relatados e identificados 103 isolados a partir do gene *NifH*, dos quais, 63% das bactérias apresentaram a capacidade de produzir ácido 3-indol acético (AIA), 22% apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato e 10% a capacidade de produzir sideróforos.

Com este mesmo intuito, Silveira et al. (2019) caracterizaram molecularmente e fisiologicamente treze bactérias endofíticas isoladas de raízes saudáveis da cana-de-açúcar cultivadas e coletadas em campo e observaram que 100% das bactérias tiveram a capacidade de produzir ácido 3-indol acético, 70% produziram sideróforos, 54% produziram metabólitos eficazes na indução de resistência à *Bipolaris sacchari*, 31% tiveram a capacidade de solubilizar fosfatos e 31% estimularam a redução de nitrato de plantas.

Portanto, ainda não há um consenso de quais mecanismos diretos de promoção de crescimento mais contribuem para os resultados positivos relatados nas pesquisas quando inoculado BPCP na cana-de-açúcar. Ainda, estas contribuições significativas na biomassa seca e raiz da cultura pelo processo de associação ainda é considerado baixo e em geral não são constantes.

Nas condições de cultivo do Nordeste brasileiro, o grupo de pesquisa da Universidade Federal Rural de Pernambuco isolou das raízes e do rizoplane das cultivares RB92579 e RB867515 alguns gêneros de bactérias promotoras de crescimento (SANTOS et al., 2012a). Os gêneros foram identificados e reinoculados nos colmos sementes das mesmas variedades em casa de vegetação. Os gêneros bacterianos *Burkholderia*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas* induziram maior incremento na biomassa da parte aérea da cana-de-açúcar (LIMA, 2012). Quando inoculados nas mesmas variedades e testados em campo no ciclo de cana planta, não foram observadas diferenças na contribuição de N via FBN quantificados via abundância natural de  $^{15}\text{N}$  aos 120 dias após inoculação, no entanto, houve incrementos na produtividade agrícola em relação à testemunha nitrogenada, com produtividade média de  $114 \text{ Mg ha}^{-1}$ , de 23% com a inoculação da *Burkholderia*, 18% com a inoculação da *Pantoea* e 16% para a mistura bacteriana das estirpes (LIMA, 2016).

Em experimentos conduzidos em área de cultivos comerciais com cana-de-açúcar em solos de textura média e em solos de textura argilosa Schultz et al. (2016) observaram incremento de 22,4% na produtividade da variedade RB72454 em resposta à inoculação de

BPCP apenas na segunda soca nos solos de textura média. Não houve incremento em solos de textura argilosa para esta variedade. Para a variedade RB867515 não houve resposta à inoculação para ambos os solos.

Pereira et al. (2013a) avaliaram seis variedades de cana-de-açúcar em campo experimental e observaram que a variedade mais responsiva à inoculação foi a RB867515 que apresentou incremento semelhante à adubação nitrogenada na variável o número de colmos e para o acúmulo de matéria seca. Porém, esta resposta não teve relação direta com o acúmulo de nitrogênio nessa variedade.

Como visto, os incrementos da FBN e da produtividade da cana-de-açúcar com uso dos BPCP são pequenos e inconsisos, principalmente em condições de campo. Por isso, alternativas que promovam maior eficiência do processo no desenvolvimento da cultura têm sido buscadas. Neste segmento, são sugeridas a avaliação de micronutrientes como o molibdênio (Mo) e o ferro (Fe) que interferem diretamente em processos chaves que envolvem as contribuições das bactérias para as plantas, bem como os processos ligados à assimilação do N na planta e são considerados essenciais a ambos organismos (KOVÁCS et al., 2015; FORLI et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

## **2.5 Interações do molibdênio no solo e seu metabolismo na cultura da cana-de-açúcar**

O molibdênio (Mo) é um oligoelemento aniônico necessário para a maioria das plantas e encontrado em baixas concentrações no solo que e geralmente refletem a composição de seus materiais originais. Na litosfera está presente em níveis médios de até 2,3 mg kg<sup>-1</sup>, mas sua concentração em rochas pode ser elevada, especialmente na presença de folhelhos, em até 300 mg kg<sup>-1</sup> (ALLOWAY, 2013).

Apesar de sua concentração nas rochas poderem ser elevadas, nos solos agrícolas o Mo apresenta uma concentração média de 1,8 mg kg<sup>-1</sup> e pode ser encontrado em minerais primários que incluem as formas de sulfetos, como a molibdenita (MoS<sub>2</sub>) e jordisita (MoS<sub>2</sub>), as formas de óxidos como a ferrimolibdenita (Fe<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) e povelita (CaMoO<sub>4</sub>), ou outros tipos de minerais como a wulfenita (PbMoO<sub>4</sub>) a depender do material de origem (ADRIANO, 2001). Mediante aos processos de intemperismo, o micronutriente presente nestes minerais primários pode passar a estar presente em minerais secundários ou fazer parte de diferentes complexos, dependendo da especiação química da zona do solo, ou pode passar a ser dissolvido e compor a solução do solo.

Apesar do micronutriente poder estar presente na solução e estar disponível às plantas, este pode apresentar disponibilidade limitada e sintomas de deficiência às culturas,

especialmente quando suas concentrações estão abaixo de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  e em regiões tropicais e subtropicais (ALLOWAY, 2013; XU et al., 2013).

O micronutriente pode ser complexado à matéria orgânica, adsorvido nos óxidos de Fe e Al ou estar solúvel em água normalmente como o ânion molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ), e em menor quantidade como ácido molibdíco ( $\text{H}_2\text{MoO}_4$ ) em que apresenta alta mobilidade (ZENG; CHENG, 2009). A distribuição dessas formas irá depender de alguns atributos do solo, pois quando em solução, o Mo se comporta de forma semelhante ao íon fosfato e apresenta reações de adsorção com a fração mineral (XU et al., 2013), e portanto, os fatores que influenciam na adsorção dos fosfatos como o pH, os teores de óxido de ferro e alumínio e os teores e tipos de argila afetam a mobilidade do molibdênio, e conseqüentemente, sua disponibilidade para as plantas, como a cana-de-açúcar (GOLDBERG, 2009; PEREIRA et al., 2013b; PETTER; TIBERG, 2015). Além da mineralogia do solo, a fração orgânica também pode apresentar papel fundamental na disponibilidade de Mo, pois os compostos orgânicos podem formar complexos de configuração octaédrica distorcida que apresentam forma estável em baixo pH (PETTER; TIBERG, 2015; WURZBURGER et al., 2012).

Como o Mo apresenta baixa disponibilidade no solo devido às suas interações, e utilização sem a devida reposição, o Mo tem-se esgotado tornando comum à sua deficiência, principalmente, no que diz respeito a cana-de-açúcar. Por esse motivo, sua absorção ocorre por meio de proteínas de alta afinidade que são específicas às baixas concentrações externas do micronutriente com gasto de energia, principalmente na forma de molibdato ( $\text{MoO}_4^{2-}$ ).

Nas plantas, o Mo é um dos micronutrientes menos exigido e apresenta quantidades inferiores a  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de matéria seca (KIRKBY, 2012), mas concentrações de 0,6 e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  são aceitas como adequadas para um crescimento normal das plantas (MALAVOLTA et al., 1997). Na cultura da cana-de-açúcar, valores entre 0,40 a  $0,99 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mo para a variedade RB867515 e de 0,59 a  $0,90 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mo para a variedade RB92579 são relatados (SANTOS et al., 2019b).

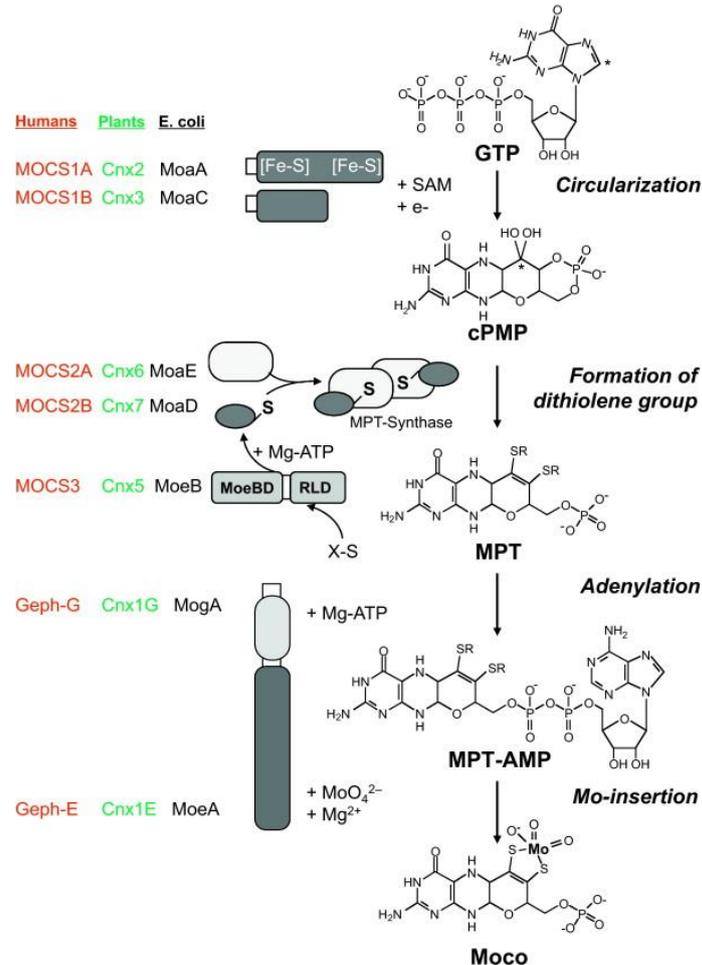
Quando absorvido, este micronutriente é parcialmente móvel na planta e pode ser prontamente utilizado ou armazenado nos vacúolos (JONES JR., 2012; MENDEL; LEIMKUEHLER, 2015). Suas funções são ligadas a ativação de enzimas em processos envolvidos na redução e assimilação de N, catabolismo de purina, síntese de ácido abscísico (ABA) e AIA e metabolismo do enxofre. Ainda, apresenta funções ligadas às bactérias diazotróficas que fazem associação com as plantas e que estão envolvidas na fixação de N.

Para que essas enzimas apresentem atividade catalítica e cumpram suas respectivas funções, o Mo deve ser complexado por um composto de pterina formando o cofator de molibdênio (Moco) (BITTNER, 2014). Esta componente apresenta o micronutriente no seu

centro ativo e sua função é o transporte de elétrons no momento das reações bioquímicas (MENDEL; LEIMKÜHLER, 2015).

A síntese da Moco em eucariotos é realizada por uma via biossintética conservada catalisada por seis enzimas designadas por Cnx (cofator – c para redutase do nitrato – n e xantina desidrogenase – x) e pode ser dividida em quatro etapas (MENDEL; SCHWARZ, 2011; IOBBI-NIVOL; LEIMKÜHLER, 2013), no qual a primeira ocorre nas mitocôndrias (TESCHNER et al., 2010) e as últimas no citoplasma (KAUFHOLDT et al., 2016).

A primeira etapa é a formação do monofosfato de piranopterinina cíclica (cPMP) no qual um derivado de guanosina (GTP) é convertido por Cnx2 e Cnx3 num composto de pterina sem enxofre com a incorporação de um carbono entre os 2 e 3 átomos de carbono da ribose, o que forma assim a nova posição C1 na cadeia lateral, o precursor Z (MENDEL; SCHWARZ, 2011). Todo o produto é exportado pelo transportador ATM3 para o citosol (Figura 03). Teschner et al., (2010) apontam o papel crucial do transportador ABC mitocondrial ATM3 na biossíntese da Moco, uma vez que mutantes de *Arabidopsis thaliana* para esse transportador acumulam monofosfato de *piranopterinina* cíclica e reduzem a atividade de molibdoenzimas a níveis quase indetectáveis. Na segunda etapa é realizada a síntese e formação da MPT em que há uma transferência de um o enxofre ao precursor Z para gerar o MPT. Essa reação é catalisada pela enzima MPT sintase que consiste em duas proteínas Cnx6 centrais e duas proteínas Cnx7, cada uma ligada a uma proteína Cnx6 (KAUFHOLDT et al., 2016). Posteriormente, o composto tem que ser ressulfurado para reativar a enzima para o próximo ciclo de reação da conversão do precursor Z, sendo catalisada pela Cnx5 e formando assim o MPT (Figura 03).



**Figura 03.** Biossíntese do cofator de molibdênio. Os passos básicos da biossíntese de Moco são mostrados, começando da GTP (parte superior direita) a Moco, incluindo enzimas que catalisam cada respectiva etapa de biossíntese de Moco para plantas (verde), humanos (vermelho) e *E. coli* (preto) e são homólogos para as espécies. A estrutura de domínio dos monômeros da enzima Mo é dada na parte inferior da figura. As enzimas Mo ativas dependem não apenas da disponibilidade de Mo, mas também da presença dos dois metais ferro e cobre. (Fonte: Mendel, Schwarz 2011).

Na terceira etapa ocorre a adenylation do MTP de forma a ligar e coordenar o átomo de Mo (MENDEL; LEIMKUHNER, 2015). Assim, o Mo é transferido para o MPT, no qual ocorre a inserção do metal por meio da ligação da enzima Cnx1G ao MPT e este passo é subdividido em duas etapas separadas: a adenylation do MTP e a formação de MPT-AMP, este último ligado covalentemente por uma ligação de pirofosfato a uma adenosina dependente de Mg-ATP (LLAMAS; MENDEL; SCHWARZ, 2005). Em ambas etapas são necessárias estruturas de coordenação tetragonal de cobre, como ligante do MPT (KUPER et al., 2004).

O último passo ocorre a inserção de molibdênio no esqueleto químico (MENDEL, 2013). O MPT-AMP é transferido do Cnx1G para o domínio Cnx1E, que cliva o adenilato do MPT-AMP e libera o cobre. Neste momento, o Mo é inserido e a estrutura torna-se uma Moco ativa. Neste passo, o Mg<sup>2+</sup> é o principal co-substrato fisiológico, mas o Zn<sup>2+</sup> também pode ser utilizado.

A Moco madura pode ser ligado às proteínas de ligação, diretamente às enzimas que precisam do molibdênio ou ao domínio de ligação da Moco sulfurase que é a fonte ligante de enxofre terminal do Moco na xantina oxidase/desidrogenase e aldeído oxidase (MENDEL, 2011).

A disponibilidade de quantidades suficientes de Mo, e conseqüentemente de Moco na planta, é essencial para atender a demanda da cultura a ativar as molibdoenzimas atuantes em diferentes processos de crescimento e desenvolvimento. Portanto, a baixa disponibilidade de Mo no solo, principalmente quando atinge o nível crítico de  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de massa seca para a planta, pode afetar as diferentes reações e limitar a produtividade das culturas.

## 2.6 O molibdênio como potencializador do ciclo de nitrogênio

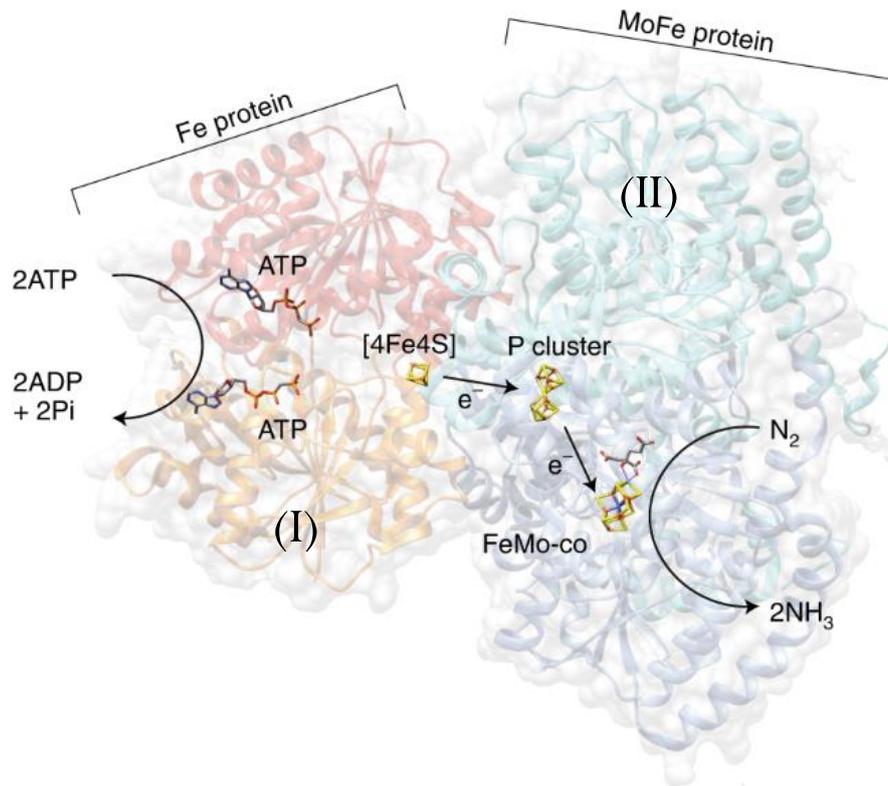
O molibdênio (Mo) é um micronutriente que apresenta papel fundamental na obtenção de N pela planta, uma vez que sua função está ligada à troca de elétrons nas enzimas nitrogenase, que atua na FBN e na redutase do nitrato (RN), que atua na assimilação do  $\text{NO}_3^-$  na planta.

A FBN é o principal processo de entrada de N nos ecossistemas e realizada por um grupo especializado de procariontes (diazotrófos) que utilizam a enzima nitrogenase para catalizar a conversão de N atmosférico em amônia ( $\text{NH}_3$ ) (KEUTER; VELDKAMP; CORRE, 2014; STÜEKEN et al, 2015). Uma vez produzidas pela nitrogenase, as duas moléculas de amônia são instantaneamente protonadas a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) devido ao valor de alcalino de pKa desse composto químico, tornando-o útil a todas as formas de organismos vivos (IPATA; PESI, 2015). Posteriormente, as BPCP podem liberar esse amônio  $\text{NH}_4^+$  na associação com a planta em troca de fotoassimilados, o que torna o nutriente prontamente disponível (OLIVARES et al., 2013).

Esse complexo enzimático é presente nas BPCP diazotróficas, no qual a regulação e estrutura da enzima são determinadas por um conjunto de genes chamados de *nif* (“*nitrogen fixation*”) (SANTOS et al., 2012b).

A enzima é dividida em dois componentes, a ferro-proteína (*Fe-protein*) e a molibdoferroproteína (*MoFe-protein*) que possuem atividade catalítica própria (Figura 04) (BITTNER, 2014). O primeiro componente é um dímero codificado pelo gene *nifH* e que apresenta peso molecular variando entre 57 a 72 kDa com centro metálico MgATP/MgADP e agrupamento 4Fe-4S. O componente da MoFe-proteína é um tetrâmero com peso molecular médio de 220 kDa com duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  codificadas pelos genes *nifDK* e que apresentam o grupamento fosfato e o cofator Mo-Fe situados no sítio ativo da componente (FOSTER et al., 2018). A

função do Mo está ligada ao transporte de elétrons durante as reações bioquímicas (HILLE, NISHINO; BITTNER, 2011; YANAGISAWA, 2014).



**Figura 04.** Estruturas, funções e diagrama da enzima nitrogenase. As posições e estruturas relativas de duas moléculas de Mg-ATP ligadas, o cluster da proteína Fe [4Fe-4S], o cluster P da proteína MoFe (8Fe-7S) e o cofator FeMo (homocitrato 7Fe-Mo-9S-X) são mostrados. Cada um é destacado. O fluxo de elétrons é do cluster [4Fe-4S] para o cluster P e o cofator FeMo. (I) Codificado pelo gene *nifH*; (II) Codificado pelo gene *nifDK*. (Adaptado de: Foster et al., 2018).

Ma et al. (2019) avaliando o impacto da aplicação de Mo na comunidade diazotrófica do sistema de arroz, com marcação de 6,7% de átomos  $^{15}\text{N}$ , mostraram que sob a aplicação de Mo, a expressão do gene *nifH* no solo foi aumentada significativamente. O micronutriente incrementou em 138% a FBN no sistema passando de 22,3 para 53,1 kg ha $^{-1}$  de N. Na cana-de-açúcar, Santos et al. (2019c) avaliando o efeito de aplicação 200 g ha $^{-1}$  de Mo em variedades de cana observaram que a atividade da nitrogenase foi estimulada na RB867515, o que implicou em melhoria de 22% da FBN com a introdução do micronutriente no sistema. Contudo, os autores sugerem que há uma variação entre genótipos de cana-de-açúcar, uma vez que houve resposta diferente para a variedade RB92579 em que a atividade da nitrogenase foi reduzida.

Além da enzima nitrogenase, o Mo também participa da RN que é responsável pela conversão do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) na rota principal de absorção de N, uma vez que essa forma é a mais abundante na maioria dos solos agrícolas, mas não é prontamente disponível às reações bioquímicas (BARTH et al., 2020).

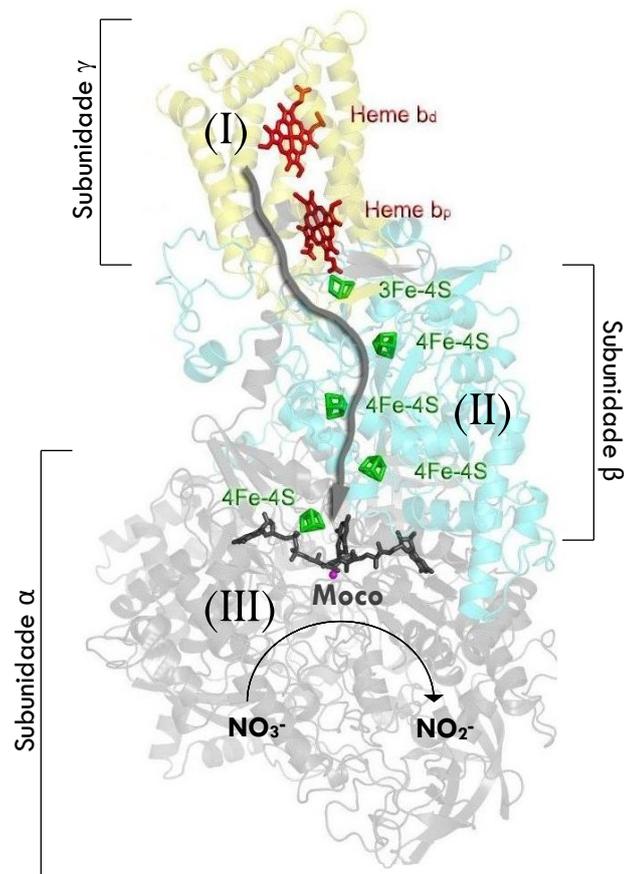
O  $\text{NO}_3^-$  é absorvido por um processo ativo secundário em proteínas de alta afinidade,

quando as concentrações no solo são abaixo de 0,5 mM, e baixa afinidade, quando as concentrações no solo são acima de 0,5 mM (NACRY; BOUGUYON; GOJON, 2013). Todo o processo de absorção ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, em simporte com  $2H^+$  e dependente de ATP para que a ATPase  $H^+$  seja capaz de manter o potencial eletroquímico através da membrana (PINTON et al., 1999).

Após a absorção, a depender das necessidades da planta, o  $NO_3^-$  pode ser prontamente reduzido e assimilado nas raízes ou ser armazenado nos vacúolos radiculares. Ainda, o nutriente pode ser transportado pelo fluxo respiratório até as folhas, onde poderá ser reduzido e assimilado ou armazenado nos vacúolos foliares (HACHIYA; SAKAKIBARA, 2017).

Para ser assimilado, o  $NO_3^-$  absorvido é reduzido a  $NO_2^-$  pela RN (MOKHELE et al., 2012; ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013) que nas plantas, é uma flavoproteína (contêm como aceitador de elétrons flavina-adenina dinucleotídeo - FAD), ativa quando composta por duas subunidades idênticas (dímero) cada uma com peso molecular de aproximadamente 100 a 120 kDa (CHAMIZO-AMPUDIA et al., 2017).

A estrutura dimérica da RN envolve três grupos prostéticos denominados  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que são codificados pelos genes NarG com peso molecular de 140 kDa, NarH com peso molecular de 60 kDa e NarI com peso molecular de 22 kDa (MAGALON; MENDEL, 2013). Cada grupo prostético apresenta seus domínios separados em um monômero dentro de cada uma das duas subunidades da holoenzima: o complexo Moco, dividido em terminal N (Moco ligação) e terminal C (medeia a dimerização), o Fe-heme do domínio do citocromo b5 e um domínio C-terminal associado a um cofator de FAD (Figura 05) (SINGH; SINGH; SHAH, 2019).



**Figura 05.** Estruturas, funções e diagrama da enzima redutase do nitrato (RN). As subunidades  $\gamma$ ,  $\beta$  e  $\alpha$  mostradas em amarelo, azul e cinza são codificadas pelo (I) gene pelo NarI (II) gene pelo NarH (III) gene pelo NarG, respectivamente. As posições e estruturas relativas a Fe-Heme [4Fe4S] e complexo Moco são mostrados. Seta cinza para baixo indica o fluxo de elétrons. (Adaptado de: ANR, 2020).

Os três domínios são unidos entre si por uma região flexíveis e sensíveis a proteases denominada encaixe. O primeiro encaixe fica situado no domínio do citocromo b5 para o domínio da dimerização e o segundo encaixe separa o domínio do citocromo e o domínio FAD.

No ciclo catalítico da enzima ocorre por uma mini cadeia de transferência de elétrons, do qual o NAD(P)H reduz a FAD e transfere elétrons através do Fe-heme do citocromo b5. Neste momento, os elétrons são transferidos do complexo Moco que ao ser reduzido tem função específica de conversão do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> para NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formando água (ANDREWS; RAVEN; LEA, 2013; CHAMIZO-AMPUDIA et al., 2017).

Em seguida, o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> gerado é transportado para o cloroplasto por sistemas específicos e reduzido a amônio por um processo catalizado pela nitrito redutase (NiR). O amônio, então, é incorporado à compostos orgânicos em razão de sua toxicidade por um processo catalizado pela glutamina sintetase / glutamina oxoglutarato aminotransferase (GS) ou glutamato sintetase (GOGAT) no ciclo GS/GOGAT de formação de aminoácidos (MOKHELE et al., 2012; CHAMIZO-AMPUDIA et al., 2017). Portanto, em hipótese, a deficiência do Mo implicará em

menor atividade das enzimas nitrogenase e RN com consequente redução do processo simbiótico e da assimilação de N.

Com base nessa pesquisa de Kovács et al. (2015) que avaliaram o efeito da aplicação de diferentes doses de Mo no acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  em mudas de milho da cultivar *Norma SC.*, o aumento da dose de Mo resultou, além de maior acúmulo do micronutriente, redução do conteúdo de  $\text{NO}_3\text{-N}$  e melhoria do conteúdo de  $\text{NH}_4\text{-N}$  no nível fisiológico de  $0,01 \mu\text{M}$ , tanto na parte aérea como na raiz. Além disso, a ausência do Mo implicou no acúmulo de ambas formas de nitrogênio na planta, o que sugere que a atividade da RN foi mais intensa sob suprimento de molibdênio bem equilibrado.

Li-Ping, Yang-ruí e Li-tao (2007) mostraram que o Mo aumenta a atividade da RN e da glutamina sintetase, o que reduz o teor de  $\text{NO}_3^-$  e incrementa o teor  $\text{NH}_4^+$  nas plantas. Em variedades de cana-de-açúcar, Santos et al. (2018) avaliaram o efeito da adubação molíbdica na redutase do nitrato na folha +1 e nas raízes das plantas e observaram que sem a aplicação do Mo houve redução na atividade da enzima em 36% e 96% nas folhas das variedades RB867515 e RB92579, respectivamente. O autor observou maior influência do adubo na atividade da enzima redutase na variedade RB92579 que apresentou média de  $0,83$  e  $0,46 \mu\text{mol NO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  na folha e nas raízes respectivamente.

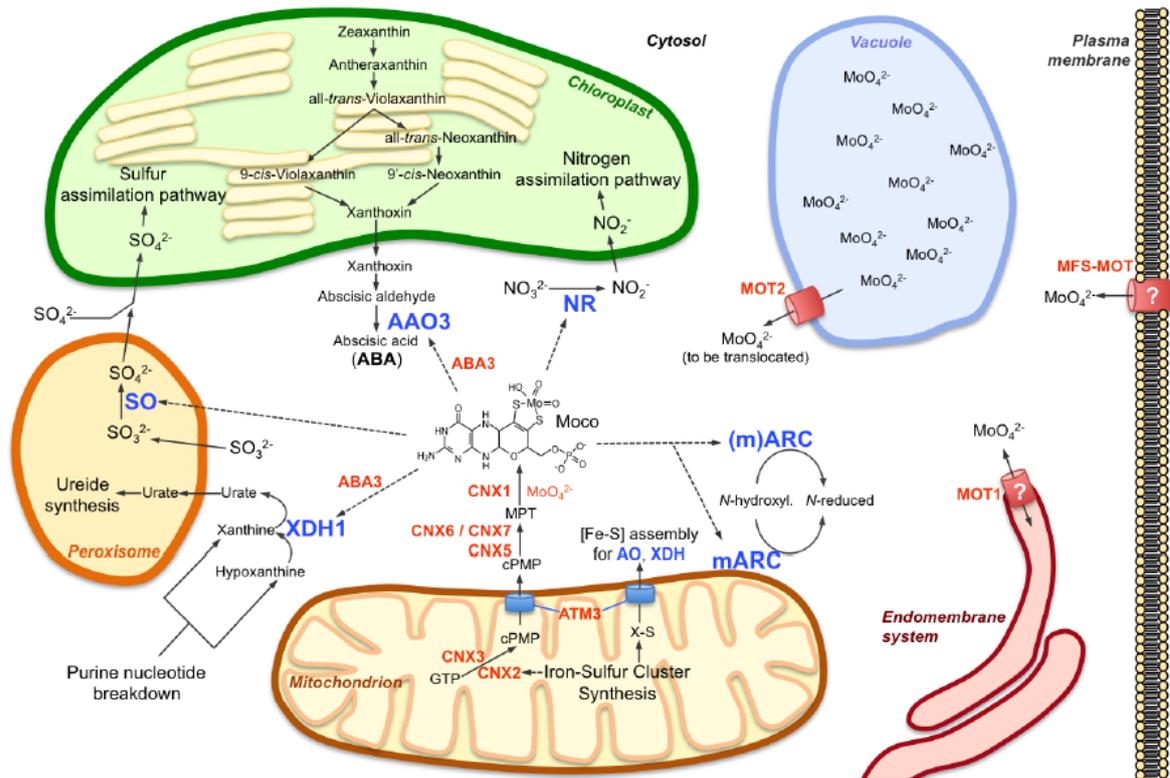
Outro fator que pode influenciar a atividade da RN na cana-de-açúcar é a inoculação, em razão das BPCP diazotróficas fornecerem diretamente o  $\text{NH}_4^+$  ou promover maior desenvolvimento do sistema radicular por ação hormonal direta o que permite a melhoria na captação de N de outras fontes (CARVALHO et al., 2014). Neste contexto, Santos et al. (2017) observaram que a atividade da redutase do nitrato em plantas de cana-de-açúcar recém brotadas era maior nas folhas de plantas inoculadas, principalmente quando em baixo suprimento de N, que estimula a associação entre microbionte e planta.

## **2.7 O molibdênio como potencializador de outras enzimas**

Até momento, mais de cinquenta enzimas dependentes de Mo foram identificadas, mas em sua grande maioria, estas enzimas são encontradas em bactérias (IOBBI-NIVOL; LEIMKÜHLER, 2013). Em eucariotos existem apenas sete (HILLE, NISHINO; BITTNER, 2011), no qual cinco destas foram identificadas em plantas.

Além da redutase do nitrato, enzima que atua no ciclo do N, outras quatro importantes molibdoenzimas são apontadas com funções envolvidas em processos cruciais da planta: a xantina oxidase/desidrogenase (XDH), envolvida no catabolismo de purina; a sulfito oxidase (SO), envolvida no metabolismo do enxofre ( $\text{SO}_4^{2-}$ ); amidoxima redutase (mARC), envolvida

na catálise redutiva de compostos hidroxilados e a aldeído oxidase (AO), envolvida na síntese de hormônios do ABA e do AIA (Figura 06) (TEJADA-JIMENEZ et al., 2013; TEJADA-JIMENEZ et al., 2017; TEJADA-JIMENEZ et al., 2018).



**Figura 06.** Metabolismo do molibdênio em células vegetais superiores. Os principais componentes do metabolismo do molibdênio nas plantas são mostrados, incluindo a via biossintética de Moco (proteínas CNX) na mitocôndria e no citosol, as enzimas do usuário Moco e suas respectivas funções principais na assimilação de nitrogênio (NR), síntese de ABA (AAO3), catabolismo de purina (XDH) e desintoxicação de sulfito (SO). As enzimas mARC são propostas para funcionar na redução de certos substratos N-hidroxilados, que ainda não foram identificados. Embora uma das duas isoformas de mARC (mARC2) contenha uma sequência de direcionamento mitocondrial  $\text{NH}_2$ -terminal, tal sequência de direcionamento está ausente na segunda isoforma, que, portanto, é assumido que atua no citosol. Em contraste com o transportador de molibdato MOT2, que funciona na membrana vacuolar como um exportador de molibdato, o MOT1 pode se localizar no sistema de endomembrana, possivelmente para o retículo endoplasmático. A função da Moco sulfurase ABA3 na ativação de AO e XDH é indicada, assim como as funções do transportador ABC mitocondrial ATM3 na exportação de cPMP da mitocôndria e na montagem do cluster ferro-sulfúrio ([Fe-S]) para AO e XDH (e outras proteínas extra-mitocôndriais). Molibdo-enzimas são indicadas por letras laranjas; as setas pontilhadas indicam a necessidade de Moco por molibdo-enzimas. (Fonte: BITNNER, 2014).

Nesta perspectiva o micronutriente Mo é apontado como um importante contribuidor do crescimento e desenvolvimento vegetal, uma vez que sua introdução no sistema planta, além de auxiliar na absorção de N, pode colaborar no incremento de  $\text{SO}_4^{2-}$  e na síntese de hormônios de crescimento na planta.

Após ser complexado por uma pterina orgânica específica para servir como um grupo prostético permanentemente ligado, a Moco madura pode ser ligada diretamente às enzimas

que precisam do molibdênio ou ao domínio de ligação da Moco sulfurase, e diferentemente da nitrogenase, as demais molibdoenzimas apresentam uma diversidade de centros catalíticos com ligantes adicionais, que podem ser uma cadeia lateral de aminoácido e/ou um, dois ou três pequenos ligantes inorgânicos que podem ser grupos oxo, sulfido ou hidróxi (DAUBNER; LANZAS, 2018).

A XDH é uma enzima que requer a Moco, FAD e dois grupos de ferro-enxofre (HILLE, NISHINO; BITTNER, 2011) e sua principal função está ligada a degradação da purina, processo em que a hipoxantina é oxidada em xantina, e que posteriormente é oxidada em ácido úrico. É uma enzima crucial para o crescimento, senescência e fertilidade, já que a redução de sua atividade é acompanhada da atividade da NADH oxidase, que forma simultaneamente ânions superóxidos, grupos de espécies reativas de oxigênio que são relacionados à resposta de estresses bióticos e abióticos (NILE; PARK, 2013; OUYANG et al., 2017).

A SO consiste em uma enzima peroxissômica de domínio de ligação sulfurado ao Moco com metabolismo fisiológico vital na oxidação de sulfito em sulfato em plantas (MENDEL, 2011). Evidências recentes mostram que essa enzima apresenta papel essencial na manutenção da homeostase do sulfito da folha no tomateiro (BRYCHKOVA et al., 2013) e na germinação de sementes do milho (XIA et al., 2015). Além disso, a ausência de atividade da SO, provoca transferência de elétrons para a formação ânions superóxidos e peróxidos de hidrogênio (BYRNE et al., 2009; HANSCH et al., 2006) e a aplicação de molibdênio auxilia na tolerância das plantas à estresses bióticos e abióticos, uma vez que aumenta a atividade da SO e reduz esse efeito do sulfito tóxico nas folhas (SHARMA et al., 2020).

As duas proteínas mitocondriais mARC foram recentemente descobertas em mamíferos com homologia ao domínio C-terminal da sulfurase do cofator de molibdênio (HAVEMEYER et al., 2006). Assim como nos mamíferos, os genomas vegetais codificam duas isoformas, mas seu papel ainda não é bem conhecido. O que se sabe é que essas enzimas metabolizam a redução de compostos N-hidroxilados, o que sugere uma função na desintoxicação na planta (CHAMIZO-AMPUDIA et al., 2011; KROMPHOLZ et al., 2012).

Embora sua função não esteja elucidada, claramente esta apresenta uma função chave de um processo essencial para a planta ou participa de uma importante via metabólica e qualquer fator que possa interferir e comprometer a biossíntese Moco resulta no comprometimento da atividade da enzima, e por consequência a inviabilidade do processo, o que pode resultar em problemas para a cultura.

A AO é uma enzima citoplasmática dependente de um complexo Moco que catalisa os passos finais na conversão de indole-3-acetaldeído em AIA e a oxidação do aldeído abscísico para ABA (MENDEL, 2011). Essa enzima pode ser encontrada na maioria dos sistemas

biológicos, incluindo plantas (ABU-ZAITOON et al., 2019), animais (KÜCÜKGÖZE; LEIMKÜHLER, 2018) e microrganismos como bactérias (PATTEN et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016) e fungos (KRAUSE et al., 2015) e apresenta alta semelhança com a XDH em sua homologia (TERAO et al., 2001; RODRIGUEZ -TRELLES; TARRÍO; AYALA, 2003).

No que se refere aos hormônios vegetais, é observado que na planta estes modificam o estado fisiológico das células, dos tecidos e, em alguns casos de sistemas mais complexos (JIYOUNG PARK et al., 2017). Neste contexto, a depender da fase de desenvolvimento que a planta se encontra, o mesmo hormônio pode produzir diferentes respostas na planta.

O AIA é o hormônio mais estudado em plantas, no qual sua atuação principal está ligada ao crescimento e desenvolvimento das culturas. Este desempenha papel na divisão e alongamento celular e desenvolvimento de raízes, folhas e flores (MCSTEEN, 2010). Especificamente, em dicotiledôneas o AIA induz a formação de raízes laterais, enquanto que em monocotiledôneas o AIA induz a formação de raízes adventícias (MCSTEEN, 2010). Além disso, influencia no aumento da espessura da parede secundária, no desenvolvimento vascular e no aumento do tamanho das células do xilema (UGGLA et al., 1996).

Quando há uma interação planta-microbionte, as bactérias que produzem o AIA o utilizam como molécula de sinalização recíproca (DUCA et al., 2014), mas esse hormônio produzido adicionalmente por esses microrganismos pode estimular na planta a formação de pêlos da raiz enquanto aumenta o número e o comprimento das raízes laterais e primárias numa faixa de concentração ideal (MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2008; MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2009).

Alguns hormônios, apresentam uma interação inversa clássica na regulação de processos de desenvolvimento da planta, como o AIA e o etileno (RAHMAN, 2013). Essa interação também está envolvida com o desenvolvimento das raízes laterais, na arquitetura das raízes e no alongamento dos pêlos radiculares (MUDAY; RAHMAN; BINDER, 2012).

O ABA está relacionado com os processos fisiológicos de fechamento dos estômatos atuando principalmente em condições de estresse hídrico (FERREIRA et al., 2017). Além disso, a interação inversa entre etileno e ABA também influencia no desenvolvimento de raízes laterais (SHKOLNIK-INBAR; BAR-ZVI, 2010) e na formação do eixo embrionário (BELIN et al., 2009).

Apesar dos hormônios desempenharem importantes papéis nos processos fisiológicos de plantas e de microrganismos e o Mo participar diretamente da atividade da enzima, essas relações ainda são pouco estudadas, especialmente no que diz respeito à cana-de-açúcar.

Em avaliação da contribuição da adubação molíbdica em interação com a bactéria *Stenotrophomonas* sp. e adubação nitrogenada na variedade RB867515, Silva (2016) observou

que apesar do incremento da biomassa seca da parte aérea ter sido significativo passando de 91,86 para 150,3 g planta<sup>-1</sup> aos 100 dias, a contribuição do N via FBN e redutase não foram significativos. Portanto, os incrementos obtidos e influenciados podem ter sido em função da promoção de crescimento, visto algumas estirpes possuem a capacidade de produzir ácido-3-indol acético (LIMA et al., 2018).

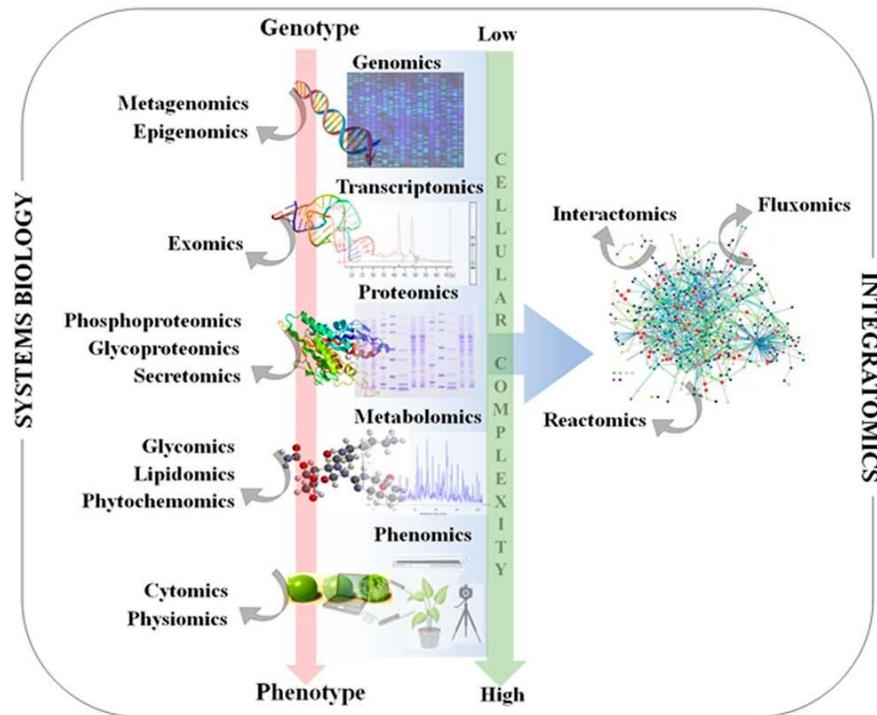
Portanto, como o Mo apresenta baixa disponibilidade no solo devido às suas interações, utilização e extração sem a devida reposição, podemos considerar que os mecanismos de manutenção do nutriente no sistema é baixo, o que implica na deficiência deste para as plantas. Portanto, diante do exposto, a fertilização molíbdica torna-se essencial para o manejo da fertilidade do solo ou como uma alternativa para auxiliar no processo da FBN, na assimilação de N via nitrato, e na promoção de crescimento de plantas via estímulo hormonal quando associada à BPCP.

## **2.8 Proteômica de cana-de-açúcar**

A proteômica é uma análise em larga escala que objetiva identificar um conjunto de proteínas que foram acumuladas num dado momento em um tecido específico (KOMATSU, 2019; LIU et al., 2019). Neste sentido, essa ferramenta analisa uma determinada célula, tecido ou organismo que esteja sob qualquer circunstância ecossistêmica (LIBAULT et al., 2017) e pode abranger resultados que podem explicar funções biológicas de um organismo, no ambiente agrícola ou natural, por revelar o perfil proteico de uma cultura (VOELCKEL; GRUENHEIT; LOCKHART, 2017).

A análise das proteínas se faz importante porque estas estão ligadas diretamente à formação de características fisiológicas que regulam fenótipos para se adaptar à determinadas mudanças (FINKA; GOLOUBINOFF, 2013). Por esse motivo, o foco da análise é identificar importantes biomarcadores que expliquem informações contidas em seus genes em nível protéico, mas com uma funcionalização progressiva do genótipo para o fenótipo (Figura 07) (MAROLI et al., 2018). A partir dessas conexões existentes na estrutura molecular, bioquímica

e fisiológica do organismo alvo, é possível prever resultados complexos e que confere distinção a cada indivíduo (RITCHIE et al., 2015).



**Figura 07.** Visão geral das diferentes técnicas multi-ômicas e genótipo-fenótipo utilizadas para análise de uma amostra complexa. Um fluxo de trabalho integrado típico é observado mais próximo do genótipo (genômica e transcriptoma) e aqueles mais próximo do fenótipo (proteômica e metabolômica), no qual os resultados podem ser caminhos simples ou redes complexas (indicado pela seta de cima para baixo) e podem incluir tanto moléculas conhecidas e novas. Para prever um resultado complexo, uma abordagem integrada a outros dados fisiológicos, bioquímicos devem ser utilizadas. (Fonte: Maroli et al., 2018).

Na cultura da cana-de-açúcar, a análise da proteômica foi iniciada em 1960, no qual padrões de isoenzimas começaram a serem realizados (BARNABAS et al., 2016). Contudo, foi em 1975, após a introdução do gel 2D por O'Farrell, que a proteômica ganhou força nos estudos para análise de extratos na cana-de-açúcar, e hoje pode ser estudado em várias partes da cultura, como folha (FONSECA et al., 2018), raiz (PACHECO et al., 2013), colmo (SALVATO et al., 2019) e meristema (BARNABAS et al., 2016) sob diferentes tipos de avaliações.

A técnica também pode ser utilizada para explicar situações que envolvam interações negativas e positivas entre a cana-de-açúcar e microrganismos. Neste contexto, com o auxílio da proteômica, pesquisas recentes foram realizadas para investigar doenças de importância econômica para a cultura, como o carvão da cana-de-açúcar (SINGH; SINGH; SHAH, 2019), o vírus do mosaico (WU et al., 2013) e a podridão vermelha (MALATHI et al., 2020). Interações positivas também têm sido avaliadas com o intuito de esclarecer quais são as proteínas específicas na relação entre planta-microbionte e que auxiliam na sinalização da

planta para o microrganismo (IMAM et al., 2017), como simbioses com fungos micorrízicos (BELARMINO et al., 2013) e bactérias diazotróficas (TERRA et al., 2019).

Trabalhos como o de Lery et al. (2008) com inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar visando o entendimento da função das proteínas e a regulação da expressão gênica conseguiu identificar proteínas produzidas diferencialmente com a inoculação, descrever possíveis vias metabólicas e relatar possível inserção dessas proteínas em rotas bioquímicas conservadas da cultura.

Terra et al. (2019) avaliando as respostas do microbionte *Nitrospirillum amazonense* ao contato de fluido apoplástico da variedade RB867515 da cana-de-açúcar observaram que algumas funções metabólicas bacterianas ativadas em resposta ao líquido apoplástico da cana-de-açúcar incluiu a superexpressão de sistemas de defesa contra espécies reativas de oxigênio (ROS) e estresse osmótico e metabolismo assimilativo de ferro.

Aguiar et al. (2018) com o propósito de descrever as alterações no perfil metabólico da cana-de-açúcar que ocorrem quando associado a inoculantes promotores de crescimento *Herbaspirillum seropedicae* e *Gluconacetobacter diazotrophicus* na variedade RB867515 observaram que foram estimulados na planta o metabolismo do ácido tricarbóxico, foram estimulados o glicuronato e os açúcares amino. Lipídios e aminoácidos foram os principais compostos induzidos pela co-inoculação, além de antioxidantes, metabólitos relacionados ao estresse e compostos envolvidos no redox celular.

De acordo com os trabalhos de Cordeiro et al. (2013) e Terra et al. (2019) que procuraram conhecer o perfil proteômico de BPCP de *Azospirillum amazonense* e de *Herbaspirillum seropedicae* com a presença do extrato da cana-de-açúcar, relatam que a exposição ao extrato de cana-de-açúcar induziu alterações metabólicas e adaptações das bactérias por sua adaptação às características peculiares do líquido. Estes trabalhos sugerem que, tanto planta como bactérias, sofrem alterações em seu perfil de proteínas para se adaptar à nova situação de associação.

Com a finalidade de entender os mecanismos que controlam o estabelecimento de tais associações de fixação N em plantas de milho com a inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* e *Azospirillum brasilense*, Brusamarello-Santos et al. (2017) avaliaram que no início do desenvolvimento a planta ativou genes de produção de etileno com ambas associações nas primeiras 72 horas após a inoculação. May et al. (2019) mostram que após um período, os genes ligados à etileno são reduzidos.

Portanto, a compreensão dos mecanismos proteicos que são reguladores da associação de BPCP e aplicação de Mo pode orientar estudos nos conhecimentos das funções determinantes para adaptação e melhorar a associação na cana-de-açúcar, uma vez que as

alterações podem ser percebidas na planta e no microbionte. Talvez, o micronutriente pode estar envolvido em outros efeitos que não serão observados com outros parâmetros de crescimento, e a combinação com a análise proteômica pode ser uma visão holística do processo de associação de microrganismos, molibdênio e a cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ZAITOON, Y. M. TAWAHA, A. R. A.; ALNAIMAT, S. M.; AL-RAWASHDEH, I. M.; ABU-ZAITON, A.; KHALIFAT, A. Investigation of the potential role of aldehyde oxidase in indole-3-acetic acid synthesis of developing rice grains. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, Salem, v. 20, n. 1–2, p. 6–13, 2019.

ADRIANO, D. C. Molybdenum. In: **Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals**. D.C. Adriano (ed.), cap 15, 2nd ed., p. 587 – 624, 2001. <<https://doi.org/10.1002/food.19870310321>>.

AGUIAR, N. O.; OLIVARES, F. L.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P. Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. **PeerJ**, v. 2018, n. 9, p. 1–28, 2018. <[doi: 10.7717/peerj.5445](https://doi.org/10.7717/peerj.5445)>.

ALLOWAY, B. J. Molybdenum. In: **Heavy metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability, Environmental Pollution**. B.J. Alloway (ed.), cap 21, 3th ed., p. 527 – 534, 2013. <[doi: 10.1007/978-94-007-4470-7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4470-7)>.

ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; LEA, P. J. Do plants need nitrate? the mechanisms by which nitrogen form affects plants. **Annals of Applied Biology**, v. 163, n. 2, p. 174–199, 2013. <[doi: 10.1111/aab.12045](https://doi.org/10.1111/aab.12045)>.

ANR – Agence Nationale de la Recherche. **ANR Project MC2: Structure and function relationships in molybdoenzymes**. 2020. Disponível em: <<https://anrnc2.wordpress.com/>>. Acesso em: 20 jun. 2020.

ANTUNES, J. E. L.; FREITAS, A. D. S. DE; OLIVEIRA, L. M. S.; LYRA, M. DO C. C. P. DE; FONSECA, M. A. C.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVEIRA, J. DE P.; ARAÚJO, A. S. F. DE; FIGUEIREDO, M. V. B. Sugarcane inoculated with endophytic diazotrophic bacteria: Effects on yield, biological nitrogen fixation and industrial characteristics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, p. 1–12, 2019. <<http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920180990>>.

ANTUNES, J. E. L.; LYRA, M. C. C. P.; OLLERO, F. J.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, L. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1–10, 2017. <[doi: 10.4238/gmr16029662](https://doi.org/10.4238/gmr16029662)>.

ARMANHI, J. S. L.; SOUZA, R. S. C. DE; DAMASCENO, N. DE B.; ARAÚJO, L. M. DE IMPERIAL, J.; ARRUDA P. A community-based culture collection for targeting novel plant growth-promoting bacteria from the sugarcane microbiome. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. January, p. 1–17, 2018. <[doi: 10.3389/fpls.2017.02191](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02191)>.

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA DIFUSÃO DE ADUBOS. **Anuário Estatístico 2019 [da] ANDA**. São Paulo, 2019, Anual.

BARNABAS, L.; ASHWIN, N. M. R.; KAVERINATHAN, K.; TRENTIN, A. R.; PIVATO, M.; SUNDAR, A. R.; MALATHI, P.; VISWANATHAN, R.; ROSANA, O. B.; NEETHUKRISHNA, K.; CARLETTI, P.; ARRIGONI, G.; MASI, A.; AGRAWAL, G. K.; RAKWAL, R. Proteomic analysis of a compatible interaction between sugarcane and *Sporisorium scitamineum*. **Proteomics**, v. 16, n. 7, p. 1111–1122, 2016. <doi:10.1002/pmic.201500245>.

BARTH, G.; OTTO, R.; ALMEIDA, R. F.; CARDOSO, E. J. B. N.; CANTARELLA, H.; VITTI, G. C. Conversion of ammonium to nitrate and abundance of ammonium-oxidizing-microorganism in tropical soils with nitrification inhibitor. **Scientia Agricola**, v. 77, n. 4, p. 2–6, 2020. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0370>.

BATISTA, M. B.; DIXON, R. Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 2, p. 603–614, 2019. <doi:10.1590/0001-3765201920180990>.

BELARMINO, L. C.; LANE DE OLIVEIRA SILVA, R.; DA MOTA SOARES CAVALCANTI, N.; KREZDORN, N.; KIDO, E. A.; HORRES, R.; PETER WINTER, P.; KAHL, G.; BENKO-ISEPPON, A. M. SymGRASS: A database of sugarcane orthologous genes involved in arbuscular mycorrhiza and root nodule symbiosis. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. SUPPL.1, p. 1–8, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S1-S2>.

BELIN, C.; MEGIES, C.; HAUSEROVA, E.; LOPEZ-MOLINA, L. Abscisic acid represses growth of the *Arabidopsis embryonic* axis after germination by enhancing auxin signaling. **The Plant Cell**, v. 21, p. 2253–2268, 2009. <www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.067702>.

BELL M. J., WOOD A., MOODY P. Introduction and trends in nitrogen fertilizer use. In: **A Review of Nitrogen Use Efficiency in Sugarcane**. (Ed.) Bell M. J. Brisbane, QLD: Sugar Research Australia; p. 8–13, 2014. <http://hdl.handle.net/11079/14735>.

BITTNER, F. Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014. <doi:10.3389/fpls.2014.00028>.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., GILARD, F., BRULÉ, L., QUILLERÉ, I., GOURION, B., RATET, P., SOUZA, E. M. DE.; LEA, P. J.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–19, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174576>.

BRYCHKOVA, G.; GRISHKEVICH, V.; FLUHR, R.; SAGI, M. An essential role for tomato sulfite oxidase and enzymes of the sulfite network in maintaining leaf sulfite homeostasis. **Plant Physiology**, v. 161, n. 1, p. 148–164, 2013. <https://doi.org/10.1104/pp.112.208660>.

BYRNE, R. S.; HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R.; HILLE, R. Oxidative half-reaction of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase: Generation of superoxide by a peroxisomal enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 51, p. 35479–35484, 2009. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067355>.

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**, v. 182–183, p. 54–66, 2013. <<https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2013.08.004>>.

CARLSSON, G.; HUSS-DANELL, K. Nitrogen fixation in perennial forage legumes in the field. **Plant and Soil**, v. 253, n. 2, p. 353–372, 2003. <[doi: 10.1023 / A: 1024847017371](https://doi.org/10.1023/A:1024847017371)>.

CARVALHO, T. L.; PIRES, E.; SARAIVA, R.; VARGAS, L.; BOMFIM, A. C. J.; BALLESTEROS, H.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nitrogen fixation in grasses - *Gluconacetobacter* activates genes in sugarcane. **BMC Proceedings**, v. 8, n. S4, p. 1–3, 2014. <<https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-o20>>.

CHAMIZO-AMPUDIA, A.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E.; LLAMAS, A. The *Chlamydomonas reinhardtii* Molybdenum Cofactor Enzyme crARC has a Zn-Dependent Activity and Protein Partners Similar to Those of its Human Homologue  $\nabla$ . **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 10, p. 1270–1282, 2011. <<https://doi.org/10.1128/EC.05096-11>>.

CHAMIZO-AMPUDIA, A.; SANZ-LUQUE, E.; LLAMAS, A.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 2, p. 163–174, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>>.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D. J.; SELVAKUMAR, G.; SUNDARAM, S. P. Novel plant growth promoting rhizobacteria-Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 38–53, 2015. <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. v.6, Brasília: CONAB, 2019a. 58 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v.7, n. 11, Brasília: CONAB, 2019b. 33 p.

CORDEIRO, F. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; HUERGO, L. F.; DE OLIVEIRA PEDROSA, F.; MONTEIRO, R. A.; DE SOUZA, E. M. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 3, p. 1142–1150, 2013. <<https://doi.org/10.1021/pr300746j>>.

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

DAUBNER, C. S.; LANZAS, R. O. Pteridines. **Reference Module in Biomedical Sciences**, p. 1–6, 2018. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.66209-8>>.

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. <<https://doi.org/10.1016/j.envdev.2015.03.004>>.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014. <<https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>>.

DUTTA, D.; PUZARI, K. C.; GOGOI, R.; DUTTA, P. Endophytes: Exploitation as a tool in plant protection. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 57, n. 5, p. 621–629, 2014. <<https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402043>>.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2020. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

ETESAMI, H.; EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v. 17, n. 4, p. 897–911, 2017. <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>>.

FAN, B.; CHEN, X. H.; BUDI HARJO, A.; BLEISS, W.; VATER, J.; BORRIS, R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, v. 151, n. 4, p. 303–311, 2011. <[doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.12.022](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.022)>.

FAO. FAOSTAT - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. 2016. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 23 set. 2016.

FAOSTAT – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#home>>. Acesso em: 01 mar. 2020.

FERREIRA, T. H. S.; TSUNADA, M. S.; BASSI, D.; ARAÚJO, P.; MATTIELLO, L.; GUIDELLI, G. V.; RIGHETTO, G. L.; GONÇALVES, V. R.; LAKSHMANAN, P.; MENOSSI, M. Sugarcane Water Stress Tolerance Mechanisms and Its Implications on Developing Biotechnology Solutions. *Frontiers Plant Science*, v. 8, p. 1077., 2017. <[doi: 10.3389/fpls.2017.01077](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01077)>.

FINKA, A.; GOLOUBINOFF, P. Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. *Cell Stress and Chaperones*, v. 18, n. 5, p. 591–605, 2013. <[doi: 10.1007/s12192-013-0413-3](https://doi.org/10.1007/s12192-013-0413-3)>.

FONSECA, J. G.; CALDERAN-RODRIGUES, M. J.; DE MORAES, F. E.; CATALDI, T. R.; JAMET, E.; LABATE, C. A. Cell Wall Proteome of Sugarcane Young and Mature Leaves and Stems. *Proteomics*, v. 18, n. 2, p. 1–12, 2018. <<https://doi.org/10.1002/pmic.201700129>>.

FORLI, F.; OTTO, R.; VITTI, G. C.; VALE, D. W. DO; MIYAKE, R. T. M. Micronutrients application on cultivation of sugarcane billets. v. 12, n. 10, p. 790 – 794, 2018. <[doi:10.5897/AJAR2016.11382](https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11382)>.

FOSTER, S. L.; BAKOVIC, S. I. P.; DUDA, R. D.; MAHESHWARI, S.; MILTON, R. D.; MINTEER, S. D.; MICHAEL J. JANIK; M. J.; RENNER, J. N.; GREENLEE, L. F. Catalysts for nitrogen reduction to ammonia. *Nature Catalysis*, v. 1, n. 7, p. 490–500, 2018. <<https://doi.org/10.1038/s41929-018-0092-7>>.

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. <[doi:10.5897/AJAR2016.11382](https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11382)>.

GILLER, K. E. Grain legumes for food, fodder and soil fertility. In: **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. (Ed) Giller, K. E., p. 140 – 168, 2001. <[doi:10.1079/9780851994178.0000](https://doi.org/10.1079/9780851994178.0000)>.

GÍRIO, L. A. DA S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization effect on the initial growth of sugarcane from pre-sprouted seedlings. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 33–43, 2015. <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100004>>.

GLICK, B. R. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. v. 2012, 2012. <<https://doi.org/10.6064/2012/963401>>.

Globalfert. Disponível em: <<https://www.globalfert.com.br/>>. Acesso em: 02 de jan. 2020.

GOLDBERG, S. Influence of Soil Solution Salinity on Molybdenum Adsorption by Soils. v. 174, n. 1, p. 9–13, 2009. <[doi: 10.1097/SS.0b013e318195b827](https://doi.org/10.1097/SS.0b013e318195b827)>.

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. <[doi: 10.1007/978-3-319-03880-3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-03880-3)>.

HACHIYA, T.; SAKAKIBARA, H. Interactions between nitrate and ammonium in their uptake, allocation, assimilation, and signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 10, p. 2501–2512, 2017. <<https://doi.org/10.1093/jxb/erw449>>.

HÄNSCH, R.; LANG, C.; RIEBESEEL, E.; LINDIGKEIT, R. GESSLER, A.; RENNENBERG, H.; MENDEL, R. R. Plant sulfite oxidase as novel producer of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6884–6888, 2006. <[doi: 10.1074/jbc.M513054200](https://doi.org/10.1074/jbc.M513054200)>.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.07.008>>.

HAVEMEYER, A.; BITTNER, F.; WOLLERS, S.; MENDEL, R.; KUNZE, T.; CLEMENT, B. Identification of the missing component in the mitochondrial benzamidoxime prodrug-converting system as a novel molybdenum enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 46, p. 34796–34802, 2006. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M607697200>>.

HEIL, J.; VERECKEN, H.; BRÜGGEMANN, N. A review of chemical reactions of nitrification intermediates and their role in nitrogen cycling and nitrogen trace gas formation in soil. **European Journal of Soil Science**, v. 67, n. 1, p. 23–39, 2016. <[doi: 10.1111/ejss.12306](https://doi.org/10.1111/ejss.12306)>.

HILLE, R.; NISHINO, T.; BITTNER, F. Molybdenum enzymes in higher organisms. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 9–10, p. 1179–1205, 2011. <[doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.034](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.034)>.

HITCHCOCK, A.S. Type species of the first 100 genera of Linnaeus "Species Plantarum". **Botanical Society of America**, v. 10, n. 9, p. 510-514, 1923. <<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1923.tb05748.x>>.

IMAM, J.; SHUKLA, P.; MANDAL, N. P.; VARIAR, M. Microbial Interactions in Plants: Perspectives and Applications of Proteomics. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 9, 2017. <<https://doi.org/10.2174/1389203718666161122103731>>.

IOBBI-NIVOL, C.; LEIMKÜHLER, S. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 8–9, p. 1086–1101, 2013. <doi: 10.1016/j.bbabi.2012.11.007>.

IPATA, P. L.; PESI, R. What is the true nitrogenase reaction? A guided approach. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 43, n. 3, p. 142–144, 2015. <doi: 10.1002/bmb.20843>.

JOHNSTONE, T. C.; NOLAN, E. M. Beyond Iron: Non-Classical Biological Functions of Bacterial Siderophores. **Physiology & Behavior**, v. 44, n. 14, p. 6320 – 6339, 2017. <doi: 10.1039/c4dt03559c>.

JONES J., J. B. Trace Elements Found in Plants. In: **Plant nutrition and soil fertility manual**. P. Marschner (ed.), New York: CRC Press, Cap 15, 2nd ed., p. 113 – 118, 2012. <doi: 10.2136/sssaj2013.0002br>

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, 2019. <doi: 10.1155/2019/4917256>.

KAUFHOLDT, D.; BAILLIE, C. K.; BIKKER, R.; BURKART, V.; DUDEK, C. A.; PEIN, L. V.; ROTHKEGEL, M.; MENDEL, R. R.; HÄNSCH, R. The molybdenum cofactor biosynthesis complex interacts with actin filaments via molybdenum insertase Cnx1 as anchor protein in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, v. 244, p. 8–18, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.12.011>.

KAVAMURA, V. N., SANTOS, S. N., SILVA, J. L. DA, PARMA, M. M., ÁVILA, L. A., VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANIA, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. DE. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>.

KEUTER, A.; VELDKAMP, E.; CORRE, M. D. Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 70, p. 38–46, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.009>.

KIRKBY, E. Introduction, Definition and Classification of Nutrients. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. P. Marschner (ed.), Cap 1, Elsevier Ltd, 3th ed., p. 3 – 5, 2012.

KOMATSU, S. Plant proteomic research 2.0: Trends and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 0–4, 2019. <doi: 10.3390/ijms20102495>.

KOVÁCS, B.; PUSKÁS-PRESZNER, A.; HUZSVAI, L.; LÉVAI, L.; BÓDI, É. Effect of molybdenum treatment on molybdenum concentration and nitrate reduction in maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 38–44, 2015. <doi: 10.1016/j.plaphy.2015.07.013>.

KRAUSE, K., HENKE, C., ASIIMWE, T., ULBRICHT, A., KLEMMER, S., SCHACHTSCHABEL, D.; BOLAND, W.; KOTHE, E. Biosynthesis and secretion of indole-3-acetic acid and its morphological effects on *Tricholoma vaccinum-spruce* ectomycorrhiza. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 20, p. 7003–7011, 2015. <https://doi.org/10.1128/AEM.01991-15>.

KROMPHOLZ, N., KRISCHKOWSKI, C., REICHMANN, D., GARBE-SCHÖNBERG, D., MENDEL, R. R., BITTNER, F.; CLEMENT, B.; HAVEMEYER, A. The mitochondrial amidoxime reducing component (mARC) is involved in detoxification of N-hydroxylated base analogues. **Chemical Research in Toxicology**, v. 25, n. 11, p. 2443–2450, 2012. <<https://doi.org/10.1021/tx300298m>>.

KÜCÜKGÖZE, G.; LEIMKÜHLER, S. Direct comparison of the four aldehyde oxidase enzymes present in mouse gives insight into their substrate specificities. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–20, 2018. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191819>>.

KUDOYAROVA, G.R.; ARKHIPOVA, T.N.; MELENĚEV, A.I. Role of Bacterial Phytohormones in Plant Growth Regulation and Their Development. In: **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**. (Ed) Maheshwari, Dinesh K., v. 12, n. February 2017, p. 337–349, 2015. <[doi: 10.1007/978-3-319-24654-3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-24654-3)>.

KUNKEL, B. N.; HARPER, C. P. The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 2, p. 245–254, 2018. <[doi: 10.1093/jxb/erx447](https://doi.org/10.1093/jxb/erx447)>.

KUPER, J.; LLAMAS, A.; HECHT, H. J.; MENDEL, R. R.; SCHWARZ, G. Structure of the molybdopterin-bound Cnx1G domain links molybdenum and copper metabolism. **Nature**, v. 430, n. 7001, p. 803–806, 2004. <<https://doi.org/10.1038/nature02681>>.

LACKNER, G.; PARTIDA-MARTINEZ, L. P.; HERTWECK, C. Endofungal bacteria as producers of mycotoxins. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 12, p. 570–576, 2009. <[doi: 10.1016/j.tim.2009.09.003](https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.09.003)>.

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.

LERY, L. M. S., COELHO, A., VON KRUGER, W. M. A., GONÇALVES, M. S. M., SANTOS, M. F., VALENTE, R. H.; SANTOS, E. O.; ROCHA, S. L. G.; PERALES, J.; DOMONT, G. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BISCH, P. M. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics**, v. 8, n. 8, p. 1631–1644, 2008. <<https://doi.org/10.1002/pmic.200700912>>.

LIBAULT, M.; PINGAULT, L.; ZOGLI, P.; SCHIEFELBEIN, J. Plant Systems Biology at the Single-Cell Level. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 11, p. 949–960, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.006>>.

LIMA, D. R. M. DE, SANTOS, I. B. DOS, OLIVEIRA, J. T. C., BARBOSA, J. G., DINIZ, W. P. DA S., FARIAS, A. R. B. DE.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Tolerance of potentially diazotrophic bacteria to adverse environmental conditions and plant growth-promotion in sugarcane. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 11, p. 1534–1548, 2018. <<https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1443212>>.

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, D. R. M. de. **Fixação biológica de nitrogênio e nutrição nitrogenada em cana planta inoculadas com bactérias diazotróficas**. 2016. 90 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2016.

LI-PING, W.; YANG-RUI, L.; LI-TAO, Y. Effects of molybdenum on nitrogen metabolism of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 9, n. 1, p. 36–42, 2007. <<https://doi.org/10.1007/BF02956911>>.

LIU, H.; CARVALHAIS, L. C.; CRAWFORD, M.; SINGH, E.; DENNIS, P. G.; PIETERSE, C. M. J.; SCHENK, P. M. Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–17, 2017. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>>.

LIU, Y.; LU, S.; LIU, K.; WANG, S.; HUANG, L.; GUO, L. Proteomics: A powerful tool to study plant responses to biotic stress. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2019. <<https://doi.org/10.1186/s13007-019-0515-8>>.

LLAMAS, A.; MENDEL, R. R.; SCHWARZ, G. Synthesis of adenylated molybdopterin: An essential step for molybdenum insertion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 53, p. 55241–55246, 2005. <[doi: 10.1074 / jbc.M409862200](https://doi.org/10.1074/jbc.M409862200)>.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 4–12, 2015. <[doi: 10.1016 / j.jplph.2014.01.002](https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.01.002)>.

MA, J., BEI, Q., WANG, X., LAN, P., LIU, G., LIN, X.; LIU, Q.; LIN, Z.; LIU, B.; ZHANG, Y.; JIN, H.; HU, T.; ZHU, J.; XIE, Z. Impacts of Mo application on biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in a flooded rice-soil system. **Science of the Total Environment**, v. 649, p. 686–694, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.318>>.

MAJEED, A.; MUHAMMAD, Z.; AHMAD, H. Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 12, p. 1599–1609, 2018. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-018-2341->>.

MALATHI, P.; KAVERINATHAN, K.; SCINDIYA, M.; ELAMATHI, E.; RAMESH SUNDAR, A.; VISWANATHAN, R. *Colletotrichum Falcatum* Causing Red Rot in Sugarcane: Genomic and Proteomic Approaches to Characterize the Pathogenic Variation. **Journal of Sugarcane Research**, v. 9, n. 2, p. 164, 2020. <<https://doi.org/10.37580/jsr.2019.2.9.164-175>>.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. DE. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2 ed., edn, Patafos: Piracicaba, 319p., 1997.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 93, n. 4, p. 425–433, 2008. <[doi: 10.1007 / s10482-007-9207-x](https://doi.org/10.1007/s10482-007-9207-x)>.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 73–80, 2009. <<https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.05.006>>.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Banco comunitário de sementes de adubos verdes: Informações técnicas. Brasília: MAPA, 52 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas do comércio exterior**. 2020. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

MARIN, F.; NASSIF, D. S. P. Climate change and the sugarcane in Brazilian: Physiology, conjuncture and future scenario. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 2, p. 232–239, 2013. <<https://doi.org/10.1590/S1415-43662013000200015>>.

MAROLI, A. S.; GAINES, T. A.; FOLEY, M. E.; DUKE, S. O.; DOĞRAMACI, M.; ANDERSON, J. V.; HORVATH, D. P.; CHAO, W. S.; THARAYIL, N. Omics in Weed Science: A Perspective from Genomics, Transcriptomics, and Metabolomics Approaches. **Weed Science**, v. 66, n. 6, p. 681–695, 2018. <<https://doi.org/10.1017/wsc.2018.33>>.

MAY, A.; MOREIRA, B. R. A.; MASCARIN, G. M.; VIANA, R. S.; SANTOS, M. S.; SILVA, E. H. F. M.; RAMOS, N. P.; SOARES DE MELO, I. Induction of drought tolerance by inoculation of *Bacillus aryabhatai* on sugarcane seedlings. **Cientifica**, v. 47, n. 4, p. 400–410, 2019. <<https://doi.org/10.15361/1984-5529.2019v47n4p400-410>>.

MCSTEEN, P. Auxin and monocot development. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 3, p. 1–18, 2010. <[doi: 10.1101/cshperspect.a001479](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001479)>.

MENDEL, R. R. Cell biology of molybdenum in plants. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 10, p. 1787–1797, 2011. <[doi: 10.1007/s00299-011-1100-4](https://doi.org/10.1007/s00299-011-1100-4)>.

MENDEL, R. R. The molybdenum cofactor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 19, p. 13165–13172, 2013. <[doi: 10.1074/jbc.R113.455311](https://doi.org/10.1074/jbc.R113.455311)>.

MENDEL, R. R.; LEIMKÜHLER, S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 337–347, 2015. <[doi: 10.1007/s00775-014-1173-y](https://doi.org/10.1007/s00775-014-1173-y)>.

MENDEL, R. R.; MAGALON, A. Biosynthesis and Insertion of the Molybdenum Cofactor. **EcoSal Plus**, v. 3, n. 1, 2015. <[doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013](https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2013)>.

MENDEL, R. R.; SCHWARZ, G. Molybdenum cofactor biosynthesis in plants and humans. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 9–10, p. 1145–1158, 2011. <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.054>>.

MOKHELE, B.; ZHAN, X.; YANG, G.; ZHANG, X. Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 92, n. 3, p. 399–405, 2012. <<https://doi.org/10.4141/CJPS2011-135>>.

MORAIS, L. K. de. et al. Melhoramento genético de cana-de-açúcar. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 1ª ed. Aracaju: Documentos/Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 38 p. 200.

MUDAY, G. K.; RAHMAN, A.; BINDER, B. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 4, p. 181–195, 2012. <[doi: 10.1016/j.tplants.2012.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.001)>.

NACRY, P.; BOUGUYON, E.; GOJON, A. Nitrogen acquisition by roots: Physiological and developmental mechanisms ensuring plant adaptation to a fluctuating resource. **Plant and Soil**, v. 370, n. 1–2, p. 1–29, 2013. <<https://doi.org/10.1007/s11104-013-1645-9>>.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. **Taxonomy**. 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

NILE, S. H.; PARK, S. W. Antioxidant,  $\alpha$ -glucosidase and xanthine oxidase inhibitory activity of bioactive compounds from maize (*Zea mays* L.). **Chemical Biology and Drug Design**, v. 83, n. 1, p. 119–125, 2014. <[doi: 10.1111 / cbdd.12205](https://doi.org/10.1111/cbdd.12205)>.

NUMAN, M.; BASHIR, S.; KHAN, Y.; MUMTAZ, R.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, A. L.; KHAN, A.; AL-HARRASI, A. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. **Microbiological Research**, v. 209, n. January, p. 21–32, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>>.

OLIVARES, J.; BEDMAR, E. J.; SANJUÁN, J. Biological nitrogen fixation in the context of global change. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 5, p. 486–494, 2013. <[doi: 10.1094 / MPMI-12-12-0293-CR](https://doi.org/10.1094/MPMI-12-12-0293-CR)>.

OLIVEIRA; R. I. de.; 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**, Queensland, v. 10, n. 1, p. 69–75, 2016.

OLIVER, R.; SILVA, M. de A. Interaction between diazotrophic bacteria and N-fertilizer doses on sugarcane crop. **Journal of Plant Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 722–736, 2018. <<https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425436>>

OUYANG, H.; HOU, K.; PENG, W.; LIU, Z.; DENG, H. Antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activities of total polyphenols from onion. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 7, p. 1509–1513, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.005>>.

PACHECO, C. M.; PESTANA-CALSA, M. C.; GOZZO, F. C.; MANSUR CUSTODIO NOGUEIRA, R. J.; MENOSSI, M.; CALSA, T. Differentially delayed root proteome responses to salt stress in sugar cane varieties. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 12, p. 5681–5695, 2013. <<https://doi.org/10.1021/pr400654a>>.

PARK, J.; LEE, Y.; MARTINOIA, E.; GEISLER, M. Plant hormone transporters: What we know and what we would like to know. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2017. <[doi: 10.1186 / s12915-017-0443-x](https://doi.org/10.1186/s12915-017-0443-x)>.

PATTEN, C. L.; BLAKNEY, A. J. C.; COULSON, T. J. D. Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 395–415, 2013. <[doi: 10.3109 / 1040841X.2012.716819](https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.716819)>.

PEREIRA, P. M.; LEMOS, V. P.; RODRIGUES, E.; FAIAL, K. C. F. Adsorção de molibdato em minerais de argilas naturais e modificadas com ácido sulfúrico, ácido húmico e ureia. **Cerâmica**, v. 59, p. 170–180, 2013b. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0366-69132013000100021>>.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. DE S.; DOS SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 363–370, 2013a. <<https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000200020>>.

PETTER, J.; TIBERG, C. Molybdenum binding to soil constituents in acid soils: An XAS and modelling study. **Chemical Geology**, v. 417, p. 279–288, 2015. <[doi: 10.1016 / j.chemgeo.2015.10.016](https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2015.10.016)>.

PINTON, R.; CESCO, S.; IACOLETTIG, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z. Modulation of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase. **Plant and Soil**, v. 215, p. 155–161, 1999. <[doi: 10.1023 / A: 1004752531903](https://doi.org/10.1023/A:1004752531903)>.

PREMACHANDRA, D.; HUDEK, L.; BRAU, L. Bacterial Modes of Action for Enhancing of Plant Growth. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 1 – 8, 2016. <[doi: 10.4172 / 2155-952X.1000236](https://doi.org/10.4172/2155-952X.1000236)>.

RAHMAN, A. Auxin: a regulator of cold stress response. **Physiologia Plantarum**, v. 147, p. 28–35, 2013. <[doi: 10.1111 / j.1399-3054.2012.01617.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01617.x)>.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA DE DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO – RIDESA. Catálogo nacional de 45 anos de variedades “RB” de cana-de-açúcar – 25 anos de RIDESA. **RIDESA**, Curitiba, 159 p. 2015.

RIDESA – Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro. **Censo varietal safra 2018/2019**. 2019. Disponível em: <<https://www.ridesa.com.br/>>. Acesso em: 26 jan. 2019.

RITCHIE, M. D.; HOLZINGER, E. R.; LI, R., PENDERGRASS; S. A.; KIM, D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 2, p. 85–97, 2015. <<https://doi.org/10.1038/nrg3868>>.

RODRIGUES, E. P.; SOARES, C. DE P.; GALVÃO, P. G.; IMADA, E. L.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; ROUWS, L. F. M.; OLIVEIRA, ANDRÉ L. M. DE.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I. Identification of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 strain using transposon mutagenesis. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–12, 2016. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01572>>.

RODRÍGUEZ-TRELLES, F.; TARRÍO, R.; AYALA, F. J. Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13413–13417, 2003. <[doi:10.1073/pnas.1835646100](https://doi.org/10.1073/pnas.1835646100)>.

ROPER, M. M.; GUPTA, V. V. S. R. Enhancing Non-symbiotic N<sub>2</sub> Fixation in Agriculture. **The Open Agriculture Journal**, v. 10, n. 1, p. 7–27, 2016. <[doi:10.2174/1874331501610010007](https://doi.org/10.2174/1874331501610010007)>.

ROSENBLUETH, M.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M. A.; REYES-HERNÁNDEZ, B. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, J. C.; REDDY, P. M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Nitrogen fixation in cereals. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–13, 2018. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>>.

SALEEM, M. F. GHAFAR, A.; ANJUM, S. A.; CHEEMA, M. A.; BILAL, M. F. Nitrogen effect on growth and yield of radish effect of nitrogen on growth and yield of radish. **Journal of agricultural research**, Florida and Louisiana Divisions, v. 48, n. 2, p. 219–225, 2012.

SALVATO, F.; LOZIUK, P., KIYOTA E.; DANLUZZI, G. S.; ARAÚJO, P.; MUDDIMAN, D. C.; MAZZAFERA, P. Label-Free Quantitative Proteomics of Enriched Nuclei from Sugarcane (*Saccharum* ssp.) Stems in Response to Drought Stress. **Proteomics**, v. 19, n. 14, p. 1–15, 2019. <<https://doi.org/10.1002/pmic.201900004>>.

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

SANTOS, P. C. DOS; FANG, Z.; MASON, S. W.; SETUBAL, J. C.; DIXON, R. Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 162, 2012b. <[doi: 10.1186 / 1471-2164-13-162](https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-162)>.

SANTOS, R. L. DOS, FREIRE, F. J., DE OLIVEIRA, E. C. A., FREIRE, M. B. G. D. S., WEST, J. B., BARBOSA, J. DE A.; MOURA, M. J. A. DE.; BEZERRA, P. DA C. Nitrate reductase activity and nitrogen and biomass accumulation in sugarcane under molybdenum and nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 43, p. 1–19, 2019b. <<https://doi.org/10.1590/18069657rbc20180171>>.

SANTOS, R. L. DOS, FREIRE, F. J., OLIVEIRA, E. C. A. DE, BARBOSA, J. DE A., MOURA, M. J. A. DE, LOPES, N. R. DA C.; COSTA, L. G. DE A. F.; GUEDES, V. H. DE F.; OLIVEIRA, D. M. DE A. SANTOS, M. B. DA C. Sampling of Sugarcane Leaves in Field Experiments to Determine the Activity of Nitrate Reductase. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 49, n. 1, p. 76–87, 2018. <<https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1421648>>.

SANTOS, R. L. DOS.; FREIRE, F. J.; DE OLIVEIRA, E. C. A.; TRIVELIN, P. C. O.; SANTOS FREIRE, M. B. G. DOS.; COSTA BEZERRA, P. DA.; OLIVEIRA, R. I. DE.; COSTA SANTOS, M. B. DA. Changes in Biological Nitrogen Fixation and Natural-Abundance N Isotopes of Sugarcane Under Molybdenum Fertilization. **Sugar Tech**, v. 21, n. 6, p. 925–935, 2019c. <<https://doi.org/10.1007/s12355-019-00717-w>>.

SANTOS, S. G. DOS.; CHAVES, V. A.; SILVA RIBEIRO, F. DA; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, n. June, p. 12–23, 2019a. <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.015>>.

SANTOS, S. G. DOS.; DA SILVA RIBEIRO; F., DA FONSECA; C. S., PEREIRA, W.; SANTOS, L. A.; REIS, V. M. Development and nitrate reductase activity of sugarcane inoculated with five diazotrophic strains. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 6, p. 863–873, 2017. <<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1357-2>>.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDAC, M. DEL C.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016. <[doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008)>.

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S. Produtividade e diluição isotópica de  $^{15}\text{N}$  em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016. <<https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000900059>>.

SECEX/MDIC. Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior 2020. **Balança comercial Brasileira**. Diversos números. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 02 jan. 2020.

SHARMA, U.; BEKTUROVA, A.; VENTURA, Y.; SAGI, M. Sulfite oxidase activity level determines the sulfite toxicity effect in leaves and fruits of tomato plants. **Agronomy**, v. 10, n. 5, 2020. <<https://doi.org/10.3390/agronomy10050694>>.

SHKOLNIK-INBAR, D.; BAR-ZVI, D. ABI4 Mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 22, n. 11, p. 3560–3573, 2010. <[doi:https://doi.org/10.1105/tpc.110.074641](https://doi.org/10.1105/tpc.110.074641)>.

SIACESP. Sindicato da Indústria de Adubos e Corretivos Agrícolas, no Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.siacesp.com.br/>>. Acesso em: 02 de jan. 2020.

SILVA, M. A. da. **Bactérias diazotróficas e adubação molíbdica na contribuição da fixação biológica de  $\text{N}_2$  em cana planta**. 2016. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

SILVEIRA, A. P. D. DA.; IÓRIO, R. DE P. F.; MARCOS, F. C. C.; FERNANDES, A. O.; SOUZA, S. A. C. D. DE.; KURAMAE, E. E.; CIPRIANO, M. A. P. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 112, n. 2, p. 283–295, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s10482-018-1157-y>>.

SINGH, P.; SINGH, I.; SHAH, K. Reduced activity of nitrate reductase under heavy metal cadmium stress in rice: an in silico answer. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. December, 2019. <<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01948>>.

SNA – Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/>>. Acesso em: 02 jan. de 2020.

STÜEKEN, E. E.; BUICK, R.; GUY, B. M.; KOEHLER, M. C. Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 666–669, 2015. <<https://doi.org/10.1038/nature14180>>.

TAULÉ, C.; CASTILLO, A.; VILLAR, S.; OLIVARES, F.; BATTISTONI, F. Endophytic colonization of sugarcane (*Saccharum officinarum*) by the novel diazotrophs *Shinella* sp. UYSO24 and *Enterobacter* sp. UYSO10. **Plant and Soil**, v. 403, n. 1–2, p. 403–418, 2016. <<https://doi.org/10.1007/s11104-016-2813-5>>.

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**, p. 35–49, 2012. <<https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>>.

TEJADA-JIMENEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA, A.; CALATRAVA, V.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E.; LLAMAS, A. From the eukaryotic molybdenum cofactor biosynthesis to the moonlighting enzyme MARC. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018. <<https://doi.org/10.3390/molecules23123287>>.

TEJADA-JIMÉNEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA, A.; GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E.; LLAMAS, Á. Molybdenum metabolism in plants. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1191–1203, 2013. <<https://doi.org/10.1039/c3mt00078h>>.

TEJADA-JIMÉNEZ, M.; GIL-DÍEZ, P.; LEÓN-MEDIAVILLA, J.; WEN, J.; MYSORE, K. S.; IMPERIAL, J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M. *Medicago truncatula* Molybdate Transporter type 1 (MtMOT1.3) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under molybdenum deficiency. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1223–1235, 2017. <<https://doi.org/10.1111/nph.14739>>.

TERAO, M.; KUROSAKI, M.; MARINI, M.; VANONI, M. A.; SALTINI, G.; BONETTO, V.; BASTONE, A.; FEDERICO, C.; SACCONI, S.; FANELLI, R.; SALMONA, M.; GARATTINI, E. Purification of the Aldehyde Oxidase homolog 1 (AOH1) protein and cloning of the AOH1 and aldehyde oxidase homolog 2 (AOH2) genes: Identification of a novel molybdo-flavoprotein gene cluster on mouse chromosome 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 49, p. 46347–46363, 2001. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M105744200>>.

TERRA, L. A., DE SOARES, C. P., MENESES, C. H. S. G., TADRA SFEIR, M. Z., DE SOUZA, E. M., SILVEIRA, V.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. Transcriptome and proteome profiles of the diazotroph *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC in response to the sugarcane apoplast fluid. **Plant and Soil**, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s11104-019-04201-y>>.

TESCHNER, J.; LACHMANN, N.; SCHULZE, J.; GEISLER, M.; SELBACH, K.; SANTAMARIA-ARAUJO, J.; BALK, J.; MENDEL, R. R.; BITTNER, F. A novel role for Arabidopsis mitochondrial ABC transporter ATM3 in molybdenum cofactor biosynthesis. **Plant Cell**, v. 22, n. 2, p. 468–480, 2010. <<https://doi.org/10.1105/tpc.109.068478>>.

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. **Sciencia Agricola**, v. 70, n. 5, p. 345–352, 2013. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000500009>>.

UGGLA, C.; MORITZ, T.; SANDBERG, G.; SUNDBERG, B. Auxin as a positional signal in pattern formation in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 17, p. 9282–9286, 1996. <<https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.9282>>.

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. <[doi: 10.1007/s11104-011-1016-3](https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3)>.

WEI, C. Y.; LIN, L.; LUO, L.; XING, Y.; HU, C.; YANG, L.; LI, Y.; AN, Q. Endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E promotes sugarcane growth. **Biology and Fertility of Soils**, v. 50, n. 4, p. 657–666, 2014. <[doi: 10.1007/s00374-013-0878-3](https://doi.org/10.1007/s00374-013-0878-3)>.

WURZBURGER; BELLENGER; KRAEPIEL; HEDIN. Molybdenum and Phosphorus Interact to Constrain Asymbiotic Nitrogen Fixation in Tropical Forests. **Plos One**, v. 7, n. 3, p. 2–8, 2012. <doi:10.1371/journal.pone.0033710>.

XIA, Z.; WU, K.; ZHANG, H.; WU, J.; WANG, M. Sulfite Oxidase is Essential for Timely Germination of Maize Seeds upon Sulfite Exposure. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 3, p. 448–457, 2015. <doi 10.1007/s11105-014-0760-y>.

ZENG, L.; YONG CHENG, C. A literature review of the recovery of molybdenum and vanadium from spent hydrodesulphurisation catalysts. Part II: Separation and purification. **Hydrometallurgy**, v. 98, n. 1–2, p. 10–20, 2009. <doi:10.1016/j.hydromet.2009.03.012>.



---

## **CAPÍTULO I**

### **ASSIMILAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N NO DESENVOLVIMENTO E NUTRIÇÃO NITROGENADA DA CANA- DE-AÇÚCAR INOCULADA COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E ADUBADAS COM MOLIBDÊNIO**

---

## ASSIMILAÇÃO E FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N NO DESENVOLVIMENTO E NUTRIÇÃO NITROGENADA DA CANA-DE-AÇÚCAR INOCULADA COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E ADUBADAS COM MOLIBDÊNIO

### RESUMO

O molibdênio (Mo) é um micronutriente que apresenta papel fundamental na obtenção de nitrogênio (N) pela planta, uma vez que sua função está ligada à troca de elétrons na atividade da enzima nitrogenase, que atua na fixação biológica de nitrogênio (FBN) e da redutase do nitrato, que atua na assimilação do  $\text{NO}_3^-$  na planta. Portanto, em hipótese, a utilização de adubo molíbdico em plantas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) pode suprir parte da necessidade de nitrogênio demandado pela planta e auxiliar o manejo nutricional do N, o que incrementa o desenvolvimento e rendimento de culturas como a cana-de-açúcar. Diante deste contexto, foi realizado um estudo em casa de vegetação para investigar a contribuição das BPCP em conjunto com o adubo Mo e associado ao N na FBN e na assimilação de N e a eficiência dessa associação na nutrição nitrogenada e no desenvolvimento da cana-de-açúcar. Para avaliar as variações biologicamente moduladas por N, Mo e BPCP na cana-de-açúcar da variedade RB867515 foram cultivadas em substrato enriquecido com 2 % de átomos de  $^{15}\text{N}$  plantas em dois ciclos: na cana planta quanto ao metabolismo e nutrição, FBN e biometria de parte aérea e na cana rebrota quanto a biometria de parte aérea e raiz. Tratamentos constituídos de cinco doses de N (0; 1,96; 2,94; 3,92 e 4,9 g vaso<sup>-1</sup>), duas doses de molibdênio (0 e 0,9 g vaso<sup>-1</sup> de Mo) e três inoculações (com inoculante ST – *Stenotrophomonas* sp.; cinco estirpes de bactérias diazotróficas que compuseram o inoculante GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *H. rubrisubalbicans*), e um tratamento controle. Em nossos resultados a FBN foi rigorosamente regulado pela disponibilidade de N, uma vez que foi reduzida drasticamente com o incremento das doses do fertilizante nitrogenado. A aplicação de Mo sem a inoculação resultou em maior absorção de N foliar, teores de  $\text{NH}_4^+$ , teores de Mo, biomassa de parte aérea (BioPA) na cana planta e rebrota e na biomassa de raiz (BioR) na cana rebrota até a dose de 3 g vaso<sup>-1</sup>. Quando houve associação do Mo ao inoculante ST, a ARN, a absorção de N foliar, teores de Mo, altura e BioPA na cana planta e BioR na cana rebrota até a dose de 3 g vaso<sup>-1</sup> foram estimulados, assim como os teores de  $\text{NO}_3^-$  foram reduzidos nos tecidos da cana-de-açúcar. Os teores de N foram estimulados pela inoculação de ST, mas não houve influência do adubo molíbdico. Nas bactérias GHABH, a aplicação do micronutriente reduziu os  $\text{TNH}_4^+$  enquanto que os  $\text{TNO}_3^-$  foram elevados, especialmente em doses inferiores a 3 g vaso<sup>-1</sup>, no qual houve diferença no acúmulo de N e na FBN. Também foram observados incrementos no diâmetro e na BioPA da cana planta e na BioPA e BioR da cana rebrota. Portanto, o micronutriente associado ao inoculante ST foi mais atuante no processo de assimilação de N via  $\text{NO}_3^-$  enquanto que na associação com o inoculante GHABH foi mais atuante na FBN. Contudo, o incremento via fonte de FBN não foi suficiente para suprir a demanda da cultura, uma vez que a fonte fertilizante contribuiu com a maior parte da nutrição nitrogenada. Nesta perspectiva, a bactéria ST associada ao Mo apresentou os melhores resultados atuando como bioestimulante e apresentam potencial para uso como novo pacote tecnológico associados a doses de N intermediárias, uma vez que estimulam o melhor crescimento e desenvolvimento da planta e o aproveitamento do N disponível mais eficiente.

**Palavras-chave:** *Saccharum* spp. Bactérias diazotróficas. Micronutrientes. Inoculantes. Redutase do nitrato.

## BIOLOGICAL ASSIMILATION AND BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE DEVELOPMENT AND NITROGEN NUTRITION OF SUGARCANE INOCULATED WITH PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA AND FERTILIZED WITH MOLIBDENUM

### ABSTRACT

Molybdenum (Mo) is a micronutrient that plays a fundamental role in obtaining nitrogen (N) by the plant, once its function is linked to the exchange of electrons in the activity of the enzyme nitrogenase, which acts in the biological fixation of nitrogen (FBN) and nitrate reductase, which acts on the assimilation of  $\text{NO}_3^-$  in the plant. Therefore, in hypothesis, the use of molybdc fertilizer in plants inoculated with plant growth-promoting bacteria (BPCP) can supply part of the nitrogen demand demanded by the plant and assist the nutritional management of N, which increases the development and yield of crops like sugar cane. In this context, a study was carried out in a greenhouse to investigate the contribution of BPCP in conjunction with the fertilizer Mo and associated with N in FBN and in the assimilation of N and the efficiency of this association in nitrogen nutrition and in the development of sugarcane-sugar. To evaluate the biologically modulated variations by N, Mo and BPCP in the sugarcane of the RB867515 variety, they were grown in a substrate enriched with 2% atoms of  $^{15}\text{N}$  plants in two cycles: in the cane plant for metabolism and nutrition, FBN and biometry of aerial parts and cane sprouts in terms of aerial and root biometry. Treatments consisting of five doses of N (0; 1,96; 2,94; 3,92 and 4,9 g vase<sup>-1</sup>), two doses of molybdenum (0 and 0,9 g vase<sup>-1</sup> of Mo) and three inoculations (with inoculant ST - *Stenotrophomonas* sp .; five strains of diazotrophic bacteria that made up the GHABH inoculant (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *H. rubrisubalbicans*). In our results, FBN was strictly regulated by the availability of N, since it was drastically reduced with the increase of nitrogen fertilizer doses. The application of Mo without inoculation resulted in greater absorption of leaf N, levels of  $\text{NH}_4^+$ , content of Mo, shoot biomass (BioPA) in plant and regrowth cane and root biomass (BioR) in cane regrowth up to the dose of 3 g vase<sup>-1</sup>. When Mo was associated with the inoculant ST, RNA, leaf N absorption, Mo content, height and BioPA in plant cane and BioR in regrowth cane even the dose of 3 g vaso<sup>-1</sup> was stimulated, as well as the  $\text{NO}_3^-$  levels were reduced in the sugarcane tissues. N levels were stimulated by ST inoculation, but there was no influence of molybdc fertilizer. In GHABH bacteria, the application of the micronutrient reduced  $\text{TNH}_4^+$  while  $\text{TNO}_3^-$  were elevated, especially at doses below 3 g vase<sup>-1</sup>, in which there was a difference in the accumulation of N and in FBN. Increases were also observed in the diameter and BioPA of sugarcane plants and in BioPA and BioR of cane sprouts. Therefore, the micronutrient associated with the inoculant ST was more active in the process of assimilation of N via  $\text{NO}_3^-$  while in association with the inoculant GHABH it was more active in FBN. However, the increase via FBN source was not sufficient to supply the crop's demand, since the fertilizer source contributed with most of the nitrogen nutrition. In this perspective, the ST bacteria associated with Mo presented the best results acting as a biostimulant and have the potential to be used as a new technological package associated with intermediate N doses, since they stimulate the best growth and development of the plant and the use of available N more efficient.

**Key words:** *Saccharum* spp. Diazotrophic bacteria. Micronutrients. Inoculants. Nitrate reductase.

## 1 INTRODUÇÃO

O agronegócio ocupa uma importante posição no Brasil representando cerca de 42,4% da balança comercial (MAPA, 2020) e dentre os setores do agronegócio, o complexo sucroenergético é o quarto mais importante o que destaca o país no cenário agrícola mundial.

Apesar dos bons números que setor sucroalcooleiro apresenta frente a contribuição no PIB, o cultivo da cana-de-açúcar é dependente dos fertilizantes nitrogenados minerais, o que eleva o custo de produção dos subprodutos do setor.

O país é considerado o quarto em consumo de fertilizantes com cerca de 182 milhões de toneladas, no qual o Nitrogênio (N) é o nutriente mais consumido na produção agrícola, sendo 60% deste total (SNA, 2018). Aliado a isso, pesquisas mostram que há um baixo aproveitamento do N-fertilizante pela cana-de-açúcar e perdas do nutriente no sistema solo (FRANCO et al., 2011; VIEIRA-MEGDA et al., 2015). Este problema evidencia a contribuição de outras fontes de N para suprir a exigência da planta, estimadas em até 260 kg ha<sup>-1</sup> para a cana planta e 182 kg ha<sup>-1</sup> para a cana soca, a depender da variedade utilizada e manejo de cultivo adotado (OLIVEIRA et al., 2016; TRIVELIN et al., 2013).

Entre as possíveis fontes de N, se destacam a mineralização da matéria orgânica do solo que contribui com 16,7% do N da planta (OTTO et al., 2013) e a fixação biológica do N<sub>2</sub> por bactérias diazotróficas que podem contribuir com até 30% do N (URQUIAGA et al., 2012).

Nesta perspectiva, o uso de bactérias diazotróficas têm despertado interesse no agronegócio, por ser um processo natural de entrada de N em sistemas agrícolas e por este motivo é apontado como uma alternativa sustentável e pouco explorada ao uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos. Esses organismos formam um grupo heterogêneo de procariotos que possuem um complexo enzimático denominado nitrogenase, enzima responsável pelo processo de FBN, e que dessa forma, contribuem para o crescimento e desenvolvimento das culturas de forma direta (FAN et al., 2011; SANTOYO et al., 2016).

Ainda assim, os incrementos na FBN na produtividade da cana-de-açúcar com uso das bactérias diazotróficas ainda são pequenos e controversos, principalmente em condições de campo, e por isso, alternativas que promovam maior eficiência do processo no desenvolvimento da cultura têm sido buscadas.

Neste segmento, são sugeridas a avaliação de micronutrientes como o molibdênio (Mo) e Ferro (Fe) que interfere diretamente em processos chaves que envolvem as contribuições das bactérias para as plantas de promoção de crescimento, bem como os processos ligados à assimilação do N na planta via assimilação o nitrato e são considerados essenciais a ambos organismos (KOVÁCS et al., 2015; FORLI et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

A enzima nitrogenase converte  $N_2$  atmosférico em amônia ( $NH_3$ ) que instantaneamente são protonadas a amônio ( $NH_4^+$ ) devido ao valor de alcalino de pKa desse composto químico, e tornam-se prontamente assimilável pelas plantas e útil aos organismos vivos (STÜEKEN et al, 2015).

Ma et al. (2019) avaliando o impacto da aplicação de Mo na comunidade diazotrófica do sistema de arroz, com marcação de 6,7% de átomos  $^{15}N$ , mostraram que sob a aplicação de Mo, a expressão do gene *nifH* no solo foi aumentada significativamente. O micronutriente incrementou em 138% a FBN no sistema passando de 22,3 para 53,1  $kg\ ha^{-1}$  de N. Na cana-de-açúcar, Santos et al. (2019c) avaliando o efeito de aplicação 200  $g\ ha^{-1}$  de Mo em variedades de cana observaram que a atividade da nitrogenase foi estimulada na RB867515, o que implicou em melhoria de 22% da FBN com a introdução do micronutriente no sistema. Contudo, os autores sugerem que há uma variação entre genótipos de cana-de-açúcar, uma vez que houve resposta diferente para a variedade RB92579 em que a atividade da nitrogenase foi reduzida.

Além da enzima nitrogenase, o Mo também participa da enzima redutase do nitrato (RN) que é responsável pela conversão do nitrato ( $NO_3^-$ ) a nitrito ( $NO_2^-$ ) na rota principal de absorção de N, uma vez que essa forma é a mais abundante na maioria dos solos agrícolas, mas não é prontamente disponível às reações bioquímicas (BARTH et al., 2020). Em seguida, o  $NO_2^-$  gerado é transportado para o cloroplasto por sistemas específicos e reduzido a amônio por um processo catalizado pela nitrito redutase (NiR). O amônio, então, é incorporado à compostos orgânicos em razão de sua toxicidade por um processo catalizado pela glutamina sintetase / glutamina oxoglutarato aminotransferase (GS) ou glutamato sintetase (GOGAT) no ciclo GS/GOGAT de formação de aminoácidos (MOKHELE et al., 2012; CHAMIZO-AMPUDIA et al., 2017).

Li-Ping, Yang-rui e Li-tao (2007) mostraram que o Mo aumenta a atividade da RN e da glutamina sintetase, o que reduz o teor de  $NO_3^-$  e incrementa o teor  $NH_4^+$  nas plantas. Em variedades de cana-de-açúcar, Santos et al. (2018) avaliaram o efeito da adubação molíbdica na redutase do nitrato na folha +1 e nas raízes das plantas e observaram que sem a aplicação do Mo houve redução na atividade da enzima em 36% e 96% nas folhas das variedades RB867515 e RB92579, respectivamente. O autor observou maior influência do adubo na atividade da enzima redutase na variedade RB92579 que apresentou média de 0,83 e 0,46  $\mu mol\ NO_2\ g^{-1}\ h^{-1}$  na folha e nas raízes respectivamente.

Outro fator que pode influenciar a atividade da RN na cana-de-açúcar é a inoculação, em razão das BPCP diazotróficas fornecerem diretamente o  $NH_4^+$  ou promover maior desenvolvimento do sistema radicular por ação hormonal direta o que permite a melhoria na captação de N de outras fontes (CARVALHO et al., 2014). Neste contexto, Santos et al. (2017)

observaram que a atividade da redutase do nitrato em plantas de cana-de-açúcar recém brotadas era maior nas folhas de plantas inoculadas, principalmente quando em baixo suprimento de N, que estimula a associação entre microbionte e planta.

Portanto, o micronutriente Mo é componente imprescindível às enzimas apresentando função ligada ao transporte de elétrons durante as reações bioquímicas e, em hipótese, a sua deficiência implicará em menor atividade das enzimas nitrogenase e redutase do nitrato com consequente redução do processo simbiótico e da assimilação de N na planta (HILLE, NISHINO; BITTNER, 2011; YANAGISAWA, 2014). Portanto, o objetivo desta pesquisa é avaliar a contribuição das bactérias promotoras de crescimento de plantas em conjunto com o adubo molíbdico e nitrogenado na nutrição, FBN e no crescimento da cana-de-açúcar.

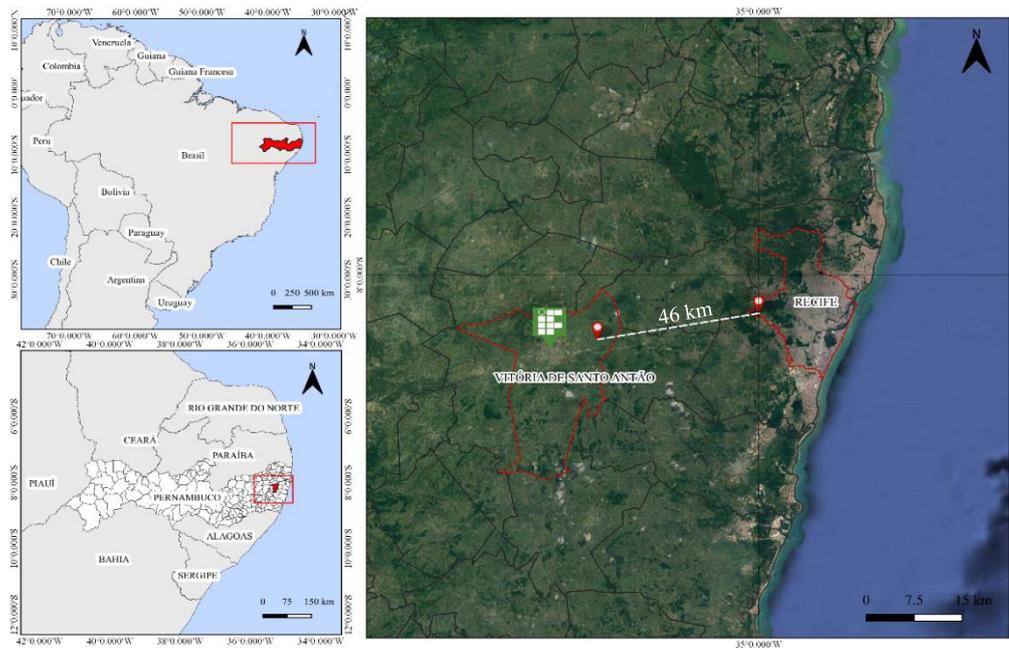
## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Execução do experimento**

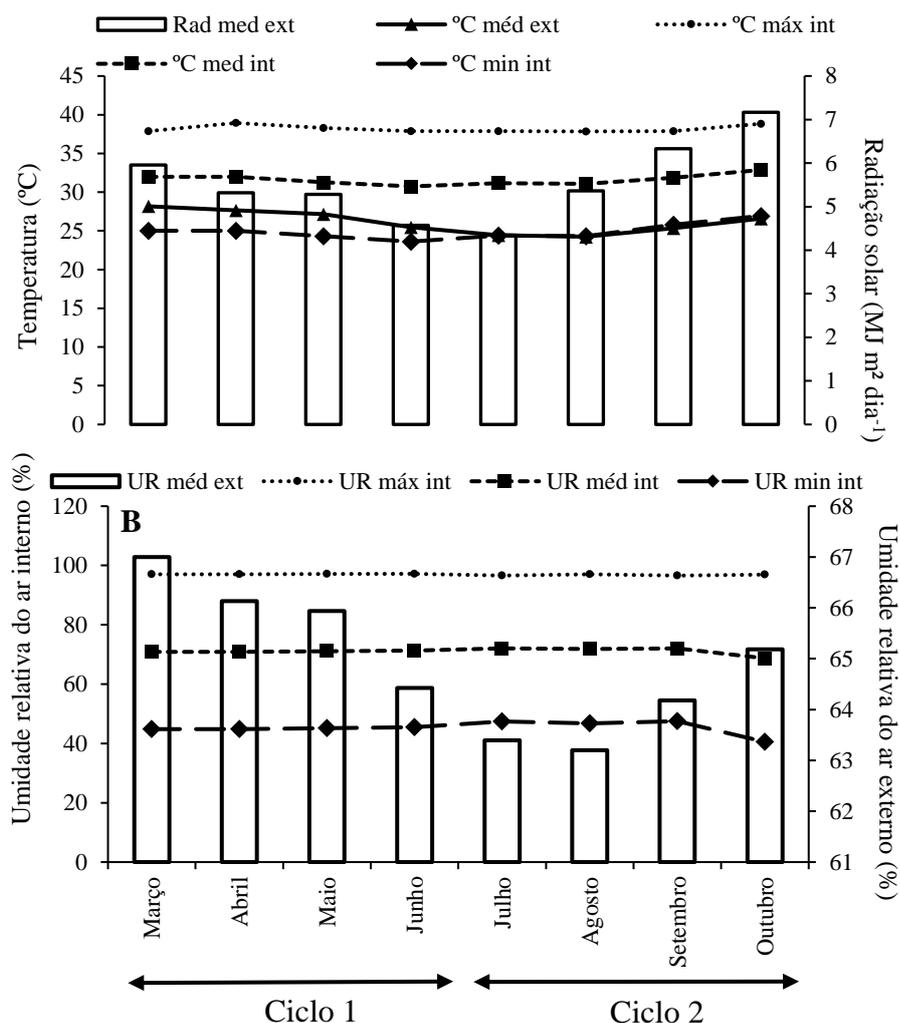
#### **2.1.1 Condução experimental**

O experimento foi conduzido no período de março a outubro de 2019, totalizando 200 dias de avaliação experimental, na casa de vegetação do Instituto Federal de Pernambuco (IFPE), situado na cidade de Vitória de Santo Antão, Estado de Pernambuco com coordenadas geográficas 8° 6' 3802'' Sul e 35° 17' 39095'' Oeste (Figura 01). O município tem altitude de 157 m, com clima predominante, segundo a classificação de Köppen (1948), As' – clima tropical com precipitações no outono e inverno, e com temperatura média anual de 24,1 °C (APAC, 2019a).

Para mensuração das temperaturas e umidades internas da casa de vegetação, foi utilizado termo-higrômetro digital modelo 7666.02.0.00 com faixa de medição de 0 – 70 °C de temperatura e 15% a 95% de umidade relativa. Para a mensuração das variáveis agrometeorológicas externas foram obtidos os dados da estação meteorológica da Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC) (APAC, 2019b) situado no bairro do Livramento, com coordenadas geográficas 8° 7' 42.96" Sul e 35° 18' 10.8" Oeste, à 4,2 km do IFPE campus Vitória de Santo Antão. A radiação, temperatura e umidade relativa médios do experimento foram 5,54 MJ m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>, 31,62 °C e 71,11%, respectivamente (Figura 02).



**Figura 01.** Mapa do Estado de Pernambuco, com destaque para o município de Vitória de Santo Antão e para o Instituto Federal de Pernambuco, com localização geográfica da casa de vegetação utilizada no experimento. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da base de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE e do Google Earth).



**Figura 02.** Dados meteorológicos do período do ensaio experimental realizado em estufa, na cidade de Vitória de Santo Antão – PE. (A) Temperatura média externa e temperatura máxima, média e mínima (°C) (B) umidade relativa do ar média externa e umidade relativa do ar máximo, médio e mínimo (%). (Fonte: Elaborada pela autora a partir da base de dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima – APAC e coleta de dados experimentais).

Os tratamentos foram constituídos a partir de cinco doses de N (0; 1,96; 2,94; 3,92 e 4,9 g vaso<sup>-1</sup> de N equivalentes a 0; 40,4; 60,2; 80,7 e 100,9 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente), duas doses de molibdênio (0 e 0,9 g vaso<sup>-1</sup> de Mo equivalentes a 0 e 1,5 kg ha<sup>-1</sup> de Mo, respectivamente) e três inoculações (com inoculante ST – UAGC 869 (*Stenotrophomonas* sp.); cinco estirpes de bactérias diazotróficas que compuseram o inoculante GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus* – BR11281T; H: *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335; A: *Nitrospirillum amazonense* – BR11145; B: *Burkholderia tropica* – BR11366T; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*) – BR11504T), e um tratamento controle sem aplicação do N, Mo e bactérias.

Como dose padrão foi escolhida a extração da cana (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus* – BR11281T; H: *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335; A: *Nitrospirillum*

*amazonense* – BR11145; B: *Burkholderia tropica* – BR11366T; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*) – BR11504T), -de-açúcar de 3,92 g vaso<sup>-1</sup> de N e de 0,9 g vaso<sup>-1</sup> de Mo, da planta em que foi aplicado apenas o nutriente na pesquisa de Silva (2016). Para as doses de N, foi realizada a redução ou incremento em 25%, como segue: 0%; 50%, 75%, 100% (dose padrão) e 125% da extração da planta e obtidas as doses de N utilizadas a partir da dose padrão. Para os inoculantes, foram escolhidos o que apresentou melhor resultado na pesquisa de Silva (2016) e o coquetel de inoculantes desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia no ano de 2008 e indicado para a cultura da cana-de-açúcar.

As parcelas experimentais foram constituídas de vasos com capacidade de 50 L ou 0,050 m<sup>3</sup>. Na parte inferior central dos vasos, foram instalados drenos com 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 drenada 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 tipo cascalhinho (nº 12) e 74 kg de substrato de areia lavada calculado para massa total do tonel, excluído a bordadura de 4 cm.

O delineamento experimental utilizado foi em bloco ao acaso em esquema fatorial 5 x 2 x 3 (N x Mo x Bac), com 4 repetições, totalizando 120 parcelas experimentais.

A caracterização química e física do substrato de areia lavada foi realizada em três amostras compostas oriundas de nove amostras simples coletadas aleatoriamente (Tabela 01). O substrato de crescimento apresentou as características a seguir: classe textural arenosa (931,30 g kg<sup>-1</sup>), alta porosidade (48%), baixo pH (4,4), baixa CTC (2,93 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>), baixo teor de matéria orgânica (2,09 g kg<sup>-1</sup>) e baixa quantidade de nutrientes (0,73 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>), de modo que a fonte principal de N para as plantas fosse o adubo nitrogenado ou o N<sub>2</sub> atmosférico. Para as análises químicas do substrato foram utilizadas as metodologias propostas pela EMBRAPA (2017), Walkley e Black (1934), Tedesco et al. (1995). Para as análises físicas do substrato foram seguidas as metodologias descritas pela EMBRAPA (2017), Bouyoucos (1926) e Kiehl (1979).

**Tabela 01.** Caracterização química e física da areia lavada antes da incubação utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação.

Atributos químicos do solo		Atributos físicos do solo	
pH <sub>água</sub> (1:2,5)	4,4	Classe textural	Arenosa
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,54	Areia total (g kg <sup>-1</sup> )	931,30
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,18	Areia muito grossa (g kg <sup>-1</sup> )	209,18
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,72	Areia grossa (g kg <sup>-1</sup> )	383,70
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,02	Areia média (g kg <sup>-1</sup> )	268,00
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,02	Areia fina (g kg <sup>-1</sup> )	54,79
P (mg dm <sup>-3</sup> )	44	Areia muito fina (g kg <sup>-1</sup> )	15,66
COT (g kg <sup>-1</sup> )	2,09	Silte (g kg <sup>-1</sup> )	25,30
<sup>15</sup> N (%)	0,58	Argila (g kg <sup>-1</sup> )	43,40
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,73	Ds (g cm <sup>3</sup> )	1,7
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,44	Dp (g cm <sup>3</sup> )	2,65
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,93	PT (%)	48
m (%)	98,63	θ <sub>cc</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	10
V (%)	24,91	θ <sub>pmp</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	0,05
PST (%)	2,74	-	-

Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.

A caracterização química da água utilizada está apresentada na tabela 02. Todos os procedimentos metodológicos da química da água foram realizados conforme APHA (2012). A água utilizada no experimento apresentou as características a seguir: Baixa condutividade elétrica (0,3225 dS m<sup>-1</sup>), pH neutro (6,6), baixa quantidade de amônia (<0,04 mg L<sup>-1</sup>) e baixa quantidade de nitrato (9,7 mg L<sup>-1</sup>) de modo que a principal fonte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fosse o adubo.

**Tabela 02.** Caracterização da água utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação

<b>Atributos químicos da água</b>	
CE (dS m <sup>-1</sup> )	0,3225
pH <sub>SM4500H+B</sub>	6,6
Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1
Mg <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1,8
Al <sup>3+</sup> total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05
Na <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	53,1
K <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	3,5
Cl <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	37
Fe (mg L <sup>-1</sup> )	0,2
Mn (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01
Cu (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	9,7
Amônia em NH <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	<0,04
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	44
Sólidos totais dissolvidos (mg L <sup>-1</sup> )	126
Dureza total em CaCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	9,9
Turbidez (uT)	4,6

Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.

### 2.1.2 Correção do substrato

Após a caracterização completa do substrato, o mesmo foi corrigido com calcário dolomítico (37,85% de CaO; 16,73% de MgO; 77,76% de PRNT) antes da instalação do experimento. 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. O calcário foi incorporado de forma homogênea a toda a massa de solo, que foi umedecido e incubado durante 15 dias. Após esse período, o substrato foi reavaliado, apresentando faixa de pH em água de 6,0.

### 2.1.3 Enriquecimento do substrato com <sup>15</sup>n

O substrato foi enriquecido utilizando o fertilizante do tipo nitrato de amônio (NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>) 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, (0,65 g nitrato de amônio com 2 % de átomos de <sup>15</sup>N por parcela).

Para facilitar a aplicação do fertilizante e a marcação do substrato, o  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  foi diluído para fazer uma solução de  $^{15}\text{N}$ -nitrato de amônio com volume final de 500 ml. O volume da solução foi calculado, conforme a 80 % da capacidade de armazenamento da água no substrato, de modo que não houvesse drenagem da solução após a aplicação e consequente perda do  $^{15}\text{N}$ .

Para a aplicação da solução enriquecida com  $^{15}\text{N}$ -nitrato de amônio foram adicionados 18,5 kg de areia no vaso, no qual foi aplicado lentamente 125 mL da solução previamente preparada com posterior homogeneização do material até que o substrato permanecesse umedecido. O procedimento foi realizado até completar o volume total do vaso com 74 kg de areia.

Após a aplicação da solução, todos os vasos foram cobertos com lona plástica escura e incubados durante 30 dias. Após esse período, o substrato foi reavaliado, apresentando faixa de de 1,02 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ . Esse processo visou elevar a abundância de  $^{15}\text{N}$  do substrato, de modo que permanecesse superior quando comparado com da atmosfera (0,3663%). Dessa forma, todos os tratamentos receberam pequena quantidade de N, que não inibisse na associação das bactérias inoculadas, mas que marcasse homogeneamente todo o solo com o adubo  $^{15}\text{N}$ -nitrato de amônio.

#### 2.1.4 Inoculação

Para o tratamento com inoculantes, foram utilizados um inoculante simples composto da estirpe UAGC 869 (*Stenotrophomonas* sp.) e um coquetel com cinco estirpes de bactérias diazotróficas que compuseram o inoculante GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus* – BR11281T; H: *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335; A: *Nitrospirillum amazonense* – BR11145; B:) – BR11504T).

A *Stenotrophomonas* sp. foi isolada da variedade de cana-de-açúcar *Burkholderia tropica* – BR11366T; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* RB867515, aos 4 meses de idade da planta e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE).

A estirpe é uma bactéria diazotrófo rizosférico que apresenta alta capacidade de produção de ácido indolacético ( $43,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *quorum sensing* e de solubilizar fosfato inorgânico (2 mm) (LIMA et al., 2018). A estirpe também apresentou os melhores resultados para produção de biomassa da parte aérea, biomassa de raiz e atividade da nitrogenase na cana-de-açúcar entre as bactérias inoculadas e avaliadas na pesquisa de Lima et al. (2018) e Silva (2016).

O coquetel de inoculantes foi constituído por cinco bactérias que foram previamente testadas para FBN e produtividade e selecionadas por Oliveira et al. (2003). As estirpes são pertencentes ao banco de coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Agrobiologia, do Instituto de pesquisa científica em Seropédica, Rio de Janeiro e são indicadas para a cultura da cana-de-açúcar.

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada raízes e colmos de espécies de *Saccharum* sp. nos estados de Pernambuco, Alagoas, São Paulo e Minas Gerais (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988). Na cana-de-açúcar é uma bactéria dependente de propagação vegetativa capaz de crescer em pH 2,5 – 3,0, mas o ideal 5,5 (STEPHAN et al., 1991) e produz enzima extracelular (invertase) (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988). Diazotrófo e endófito obrigatório encontrada nos espaços intercelulares de plantas de diversas famílias (CHAWLA et al., 2014) sendo capaz de produzir AIA no desenvolvimento inicial das raízes ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (CHAVES et al., 2015), solubilizar médias quantidades de fosfato (1,0 mm) e de zinco (2 mm) (INTORNE et al., 2009), e biocontrole de patógenos (SARAVANAN et al., 2008). Além disso, apresenta intensa associação com fungos micorrízicos (MEENAKSHISUNDARAM; SANTHAGURU, 2011) e seu proteoma é bastante estudado em associação com a cana-de-açúcar (LERY et al., 2008).

O *Herbaspirillum seropedicae* foi identificado inicialmente em raízes esterilizadas de milho, sorgo e arroz (BALDANI et al., 1984), mas foi isolada da variedade de cana-de-açúcar SP701143 (OLIVEIRA et al., 2003). Diazotrófo e endófito obrigatório habitam espaços intercelulares da ponta das raízes jovens (CANELLAS et al., 2017) sendo comumente estudada em plantas de cana-de-açúcar (CHAVES et al., 2015), milho (CANELLAS et al., 2013) e arroz (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2011). Apresenta baixa produção de AIA ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (YIN; PIN; GHAZALI, 2015), alta produção de agentes antifúngicos ou antibacterianos (proteção) e sideróforos (LOACES; FERRANDO; SCAVINO, 2011; MONTEIRO et al., 2012). Também apresenta estudos do seu proteoma em associação à cana-de-açúcar.

A *Nitrospirillum amazonense* foi identificada inicialmente de raízes de *Brachiaria brizantha* (MAGALHÃES, 1983), mas essa estirpe foi isolada da variedade de cana-de-açúcar SP775181 (OLIVEIRA et al., 2003). Diazotrófo e endofítico facultativo apresenta melhor crescimento em solos de pH 5,5 – 7 (DÖBEREINER; MARRIEL; NERY, 1976), alta produção de AIA ( $49,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (TERRA et al., 2019), produção média de giberelina (ILYAS; BANO, 2010) e produtora de citocinina e ácido abscísico, mas o efeito destes é pouco estudado na planta (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979; COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008), e por isso é considerada uma bactéria de múltiplos mecanismos.

A *Burkholderia tropica* inicialmente identificada em plantas de arroz, cana-de-açúcar e batata (BALDANI et al., 1995), mas foi isolada de brotos da variedade SP711406 sendo posteriormente propostas duas novas espécies: *B. brasilensis* e *B. tropicalis* (OLIVEIRA et al., 2003; BALDANI; BALDANI, 2004). Por este motivo, este grupo difere na tolerância ao pH, uso de fontes de carbono, tipo de colônia e tolerância osmótica (BALDANI; BALDANI, 2004). Diazotrófo e endofítico obrigatório apresenta baixa produção de AIA ( $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Alta solubilização de fosfato (4,0 mm) e alta produção de sideróforos (18,5 mm) (CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Essas estirpes demonstram alta frequência de ocorrência em plantas de cana-de-açúcar e arroz, mas por apresentarem características semelhantes às *Pseudomonas* sp. que causam manchas, podridão, murcha, nanismo, estria mosqueada na cana-de-açúcar não é bem aceita como inoculante.

O *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi primeiramente identificado em colmos de cana-de-açúcar do estado de PE (DÖBEREINER et al. 1990) e geralmente, são encontradas colonizando o mesófilo foliar dessa planta (MONTEIRO et al., 2012). Diazotrófo e endofítico obrigatório apresentam muitas características semelhantes às *Pseudomonas rubrisubalbicans* que causam em algumas cultivares de cana-de-açúcar a estria mosqueada (OLIVARES et al., 1997).

Todas as bactérias foram repicadas em meio DYGS sólido pH 6,0 e específico para bactérias diazotróficas (RODRIGUES NETO et al., 1986). Após o crescimento as bactérias foram novamente repicadas e multiplicadas em DYGS líquido pH 6,0 para realização da inoculação conforme Araújo et al. (2010).

Os colmos sementes, então, foram mergulhados separadamente por 30 minutos em solução com densidade de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para cada estipe em estudo e posteriormente agitados a cada 10 minutos em recipiente com capacidade para 30 L, mantendo a temperatura da solução próxima dos  $25^\circ\text{C}$  (ARAÚJO et al., 2010).

Após a inoculação das bactérias, os colmos sementes inoculados foram separados para o plantio no período da noite em horários semelhantes.

### **2.1.5 Plantio da cana planta**

Para condução do experimento foram utilizados colmos sementes da variedade de cana-de-açúcar RB867515 por ser a variedade mais plantada nos canaviais brasileiros (RIDESA, 2015) e já ser identificada como uma variedade responsiva à inoculação de microrganismos promotores de crescimento (SCHULTZ et al., 2012; PEREIRA et al., 2013).

Os rebolos sementes foram obtidos na Usina São José Agroindustrial na forma de mini-rebolos, medindo aproximadamente 3 cm de comprimento, com uma gema viável.

Os colmos sementes inoculados e não inoculados seguiram para o plantio, distribuídos quatro colmos por vaso, dispostos em dois sulcos com aproximadamente 10 cm de profundidade e cobertos com o substrato do próprio vaso. Posteriormente, após a brotação das plantas, foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta para condução do experimento.

O ciclo de cana planta foi conduzido até os 100 dias após a brotação das plantas (DAG), de forma que, o volume do vaso não limitasse o desenvolvimento das variedades em casa de vegetação.

### **2.1.6 Plantio das plantas referências**

Com o intuito de determinar a FBN, foram adicionadas algumas parcelas dentro de cada bloco, para o cultivo de espécies vegetais consideradas referências, ou seja, espécies que apresentam pouca capacidade ou nenhuma de fazer associação com bactérias fixadoras de N.

Para isso, foram cultivados o Sorgo (F15), o Algodão (BRS Jade), o Girassol (BRS 322), o Milheto (IPA Bulk-1-BF) e a Mamona (BRS 149 Nordestina). Todas as sementes foram adquiridas no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizado no município de Recife, Pernambuco. Também foram consideradas referências, conforme o resultado obtido no trabalho de Silva (2016), as parcelas cultivadas sem e com aplicação apenas do N.

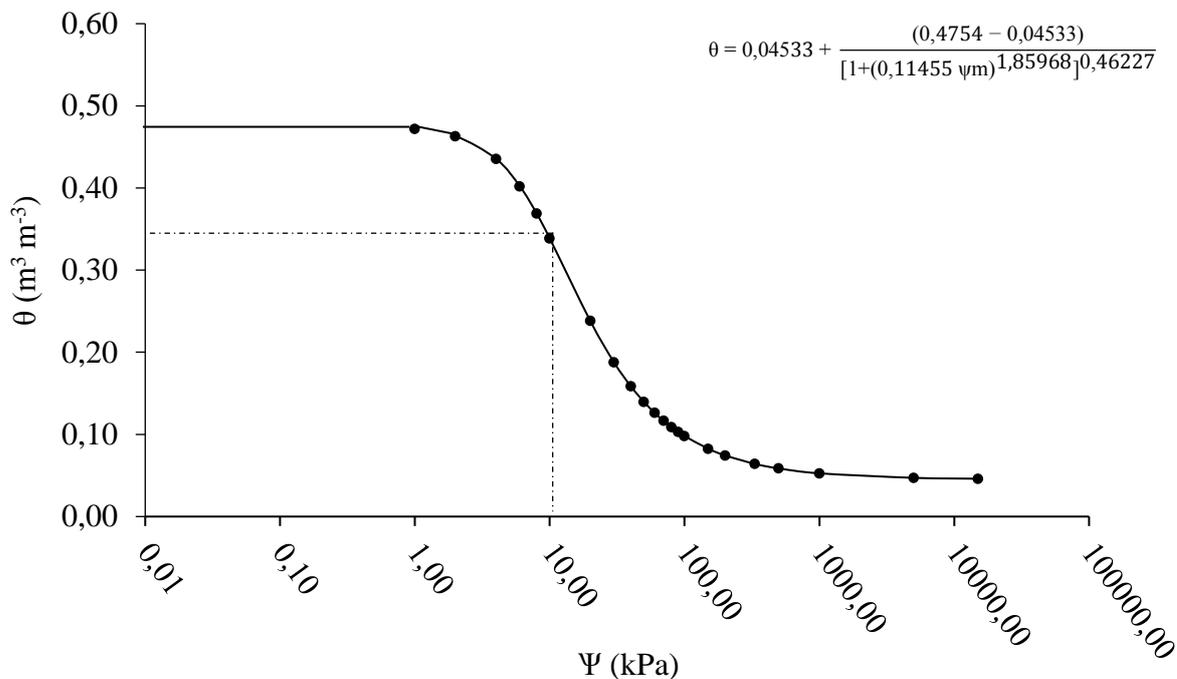
Neste sentido, para o cálculo das médias da abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  em excesso na folha +1 da cana-de-açúcar o tratamento que apresentou maior abundância de  $^{15}\text{N}$  foi a cana-de-açúcar com dose de N de  $4,90 \text{ g vaso}^{-1}$ . Por este motivo, esta planta foi considerada como referência padrão neste estudo, uma vez que apresentou 1,71 % átomos  $^{15}\text{N}$ , valor próximo à marcação do solo em 2%.

### **2.1.7 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. 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 do primeiro bloco tensiômetros na profundidade de 30 cm, que com auxílio do tensímetro analógico e da Curva Característica de Retenção de Água do Solo (CCRAS) (Figura 09), o valor de tensão obtidos foi transformado em volume de água necessários para reposição da umidade

próxima à 80 % da capacidade máxima de adsorção de água do solo. Para determinar 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 03.** Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) para o substrato arenoso utilizado no experimento de cana-de-açúcar. Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 2.1.8 Nutrição

Para o manejo nutricional da cana-de-açúcar foram produzidas soluções padrões constituídas das doses de Mo e N equivalente as doses utilizadas. Como fonte de N foi utilizado o nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) enriquecido com 2 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ . Para o Molibdênio foi utilizado o ácido molibídico

Para os demais nutrientes, foi formulada uma solução com base em Arnon e Hoagland (1950) por ser a solução para sistemas hidropônicos atualmente mais utilizada. A solução formulada e utilizada no experimento continha os demais macronutrientes e micronutrientes, com exceção do N e Mo.

A composição química da solução indicada pelos autores 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.

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.

Nesses intervalos, era realizada a irrigação diária das plantas. A aplicação foi realizada com regadores de capacidade de 1 L 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  $\text{dS m}^{-1}$ . Durante a realização do ensaio experimental, os valores de pH (6,2 a 6,8) e CE (1,2 a 1,9  $\text{dS m}^{-1}$ ) das soluções nutritivas permaneceram na faixa permitida, não necessitando ajuste.

## **2.2 Avaliações da cana planta**

O tempo de avaliação da cana-de-açúcar foi identificado com base nos resultados de Santos et al. (2019c) que observou aos 100 dias após o plantio (DAP) a máxima atividade da nitrogenase e da FBN, respectivamente.

### **2.2.1 Análises biométricas da cana planta**

Para realizar a avaliação final aos 100 dias (cana planta), foram realizadas avaliações biométricas de altura da planta (alt) e o diâmetro do colmo (dia), bem como foi quantificada a biomassa seca da parte aérea por planta.

Para a altura, foi mensurado, com auxílio de uma trena graduada, o comprimento a partir da base da planta rente ao solo até a bainha da folha mais alta que apresentava o colarinho visível (folha +1). O diâmetro foi avaliado no colmo da planta utilizando um paquímetro digital na altura de 1 cm a partir do solo.

Após as avaliações não destrutivas, as plantas foram cortadas rente ao solo e em seguida, 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 (BioPA) em  $\text{g vaso}^{-1}$ .

## **2.3 Condução experimental da cana rebrota**

Para realizar a avaliação da cana rebrota, após a coleta da cana planta aos 100 DAG se iniciou um novo ciclo de condução experimental deixado rebrotar as plantas dos vasos após o corte. Para esse novo ciclo, foi utilizado como referência os resultados de Santos et al. (2019c)

que observou aos 100 dias após o plantio (DAP) a máxima atividade da nitrogenase e da FBN, respectivamente. Por este motivo, a coleta de cana rebrota foi realizada aos 100 dias após a rebrota (DAR).

Todos os procedimentos de condução citados no item 2.1.7 e 2.1.8 foram realizados de igual forma até a germinação das plantas.

### **2.3.1 Reinoculação da cana rebrota**

Após rebrota das plantas foi realizada a reinoculação das estirpes no vaso. Para isso, quando as plantas se encontravam com 5 cm de altura o mesmo procedimento de repicagem e multiplicação das bactérias em meio líquido citado no item 2.1.4 foi realizado.

O meio líquido com densidade de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para cada estirpe foi diluído na proporção 1:50 para que a solução apresentasse a mesma densidade do primeiro ciclo, conforme procedimentos de Araújo et al. (2010). O inoculante simples e o misto foi aplicado no volume de 2 mL do meio líquido na base da planta e todos os procedimentos de condução citados no item 2.1.7 e 2.1.8 foram realizados de igual forma durante todo o novo ciclo até a coleta.

### **2.3.2 Análises biométricas da cana rebrota**

Para realizar a avaliação final aos 100 dias (cana rebrota), foram realizadas avaliações biométricas de altura da planta (alt) e o diâmetro do colmo (dia), bem como foi quantificada a biomassa seca da parte aérea por planta.

Para a altura, foi mensurado, com auxílio de uma trena graduada, o comprimento a partir da base da planta rente ao solo até a bainha da folha mais alta que apresentava o colarinho visível (folha +1). O diâmetro foi avaliado no colmo da planta utilizando um paquímetro digital na altura de 1 cm a partir do solo.

Após as avaliações não destrutivas, as plantas foram cortadas rente ao solo e em seguida, levadas à estufa de circulação forçada de ar ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até atingir peso constante. Quando secas, as amostras foram pesadas para a obtenção da biomassa seca da parte aérea (BioPA) em  $\text{g vaso}^{-1}$ . Para obter o peso em  $\text{g planta}^{-1}$ , o valor total final avaliado de peso foi dividido pelo número de perfilhos em cada vaso.

As avaliações de biomassa seca de raiz (BioR) foram realizadas no final do segundo ciclo de crescimento aos 100 DAR e o todo o material foi retirado de dentro do vaso em peneira com abertura de 2 mm para separar a areia do material vegetal. Posteriormente, todo o material de raiz foi levado ao laboratório e sobre a peneira de 2 mm, o material foi lavado em água

corrente e separado do substrato. Em seguida, o material foi levado à estufa de circulação forçada de ar para a secar até atingirem peso constante (60 °C/72 horas).

O material vegetal da raiz foi pesado para a obtenção da BioR em g vaso<sup>-1</sup>. Para obter o peso em g planta<sup>-1</sup>, o valor total final avaliado foi dividido pelo número de perfilhos que havia em cada vaso.

## **2.4 Análises laboratórias da cana planta**

### **2.4.1 Atividade da enzima redutase do nitrato**

A atividade da ARN aos 100 DAG seguiu a metodologia de Jaworski (1971) com modificações proposta por Santos et al. (2014). Para isso, foram coletados os terços médios das folhas +2 no horário entre 12-14 h, depois foram acondicionadas em caixa de isopor com gelo até o término da coleta. Posteriormente, os materiais coletados foram levados para o laboratório e, com auxílio de um furador de folhas, 25 discos foliares com 1 cm de diâmetro e posteriormente foram acondicionados em recipientes plástico de cor preta. Todos os discos foram obtidos excluindo a nervura central.

Nos recipientes foram adicionados o meio de incubação composto por 2,5 mL de KNO<sub>3</sub> 300 mmol L<sup>-1</sup>; 2,5 mL de Tampão fosfato 285 mmol L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> e 0,5 mL de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (0,02%). A mistura foi homogeneizada e 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 ARN foi estimada em µmol de nitrito liberado por g de tecido fresco por hora de incubação (µmol g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> NO<sub>2</sub><sup>-</sup> gMF) e calculada com base em equação linear obtida a partir do preparo prévio de curva padrão.

### **2.4.2 Teor de nitrogênio total**

Para a determinação do teor N total da parte aérea (TN), a parte aérea foi coletada, pesada, secas em estufa e moídas em moinho de facas TE-650 TECNAL. Em amostras secas foi procedida a digestão do material e destilação do N mineralizado da amostra utilizando o método proposto pela EMBRAPA (2009).

Para a destilação do material, o tubo digestor contendo o N mineralizado pela foi conectado ao destilador de arraste de vapores (método Kjeldahl) e foi procedida a destilação em 25 ml da solução de  $H_3BO_3$  até completar 45 ml de solução. O material foi titulado com solução de  $HCl$  ( $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ). Para o cálculo do N total do material, foi utilizada a equação 01:

$$N-NH_4 \text{ (g kg}^{-1}\text{)} = (Vb - Va) \times 1,4 \quad [E1]$$

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).

### 2.4.3 Teor de amônio e nitrato

Para determinação dos teores de N mineral foi utilizada metodologia proposta por Tedesco et al. (1995). As amostras de tecido vegetal de parte aérea foram moídas e passadas em peneira de 20 mesh. Do material obtido, foi pesado 1 g de tecido vegetal seco e transferido para um pote. A seguir, foram adicionados 15 mL de  $KCl$  ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e preparadas amostras em branco. As amostras foram mantidas sob agitação constante por 5 min, e posteriormente filtradas. Da solução filtrada foi retirado 5 mL e levada para tubo digestor.

Adicionou-se 0,2 g de  $MgO$  e foi precedida a destilação em 5 ml da solução de  $H_3BO_3$  até completar 35 - 40 ml de solução. A solução foi titulada com solução de  $H_2SO_4$  ( $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$ ).

A partir deste primeiro destilado, foi adicionado 0,2 g de liga devarda e foi precedida uma nova destilação em 5 ml da solução de  $H_3BO_3$  até completar 35 - 40 ml de solução. O material foi titulado com solução de  $H_2SO_4$  ( $0,0025 \text{ mol L}^{-1}$ ). Os teores de  $NH_4$  e  $NO_3^-$  foram calculados de acordo com a equação 02:

$$N-NH_4 \text{ ou } N-NO_3^- \text{ (mg kg}^{-1}\text{)} = \frac{\text{mL H}^+ \text{ amostra} - \text{mL H}^+ \text{ branco}}{\text{g amostra}} \quad [E2]$$

### 2.4.4 Teor de molibdênio

Para a determinação do teor Mo total da parte aérea (TMo), 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 500 mg de amostra de planta que foi transferida para um tubo digestor. No tubo, foi adicionado 8 mL da mistura ácida ( $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ ) e o material foi mantido a frio por um curto período. Após, o material foi levado ao bloco digestor e foi aquecido lentamente por um período de 3 a 4 horas nas temperaturas de 120 °C e 200 °C. O volume final do extrato foi completado para 25 mL com água destilada.

Ao final do processo, retirou-se uma alíquota de 3 mL do extrato, no qual a seguir foram adicionados 1 mL de solução de  $\text{NH}_4\text{F}$  (0,0025%), 1 mL da solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  diluído, e 1 mL de KI (0,5%). A mistura foi homogeneizada, e após exatamente 5 minutos o volume foi transferido para uma cubeta de vidro e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 420 nm, após a adição do KI.

O teor de molibdênio na planta foi estimado em  $\text{mg kg}^{-1}$  e calculado com base em equação linear obtida a partir de preparo prévio de curva padrão. Para o cálculo do Mo total do material em  $\text{mg kg}^{-1}$ , foi utilizada a equação 08:

$$\text{Mo (mg kg}^{-1}\text{)} = \text{mg L}^{-1} \times 5 \quad [\text{E3}]$$

No qual,  $\text{mg L}^{-1}$  é o valor encontrado com base na equação gerada pela curva padrão.

#### 2.4.5 Estimativa da fixação biológica do $\text{N}_2$

A estimativa da FBN foi realizada aos 100 DAG, no qual foi determinada a abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  em amostras de folha +1 que, segundo Boddey et al. (2001), representam a marcação isotópica de toda a planta. As amostras das folhas 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). Todo o material utilizado foi limpo com álcool 70 % em abundância e as amostras foram moídas em ordem crescente de concentração de  $^{15}\text{N}$  para que não houvesse contaminação entre as amostras.

A abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  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  $^{15}\text{N}$  nos tratamentos e os valores de  $^{15}\text{N}$  encontrados na planta referência (Equação 4). Para o presente estudo, a cana-de-açúcar adubada com a dose mais alta de N foi considerada a planta controle mais adequada em virtude de sua menor diluição isotópica (1,71375 % átomos), ou seja, a porcentagem de átomos de  $^{15}\text{N}$  foi semelhante a marcação do solo, estimada em 2 %.

$$\% \text{ Ndffix} = \left[ 1 - \frac{(\%A^{15}\text{N}_{\text{excesso}})_{\text{cultura}}}{(\%A^{15}\text{N}_{\text{excesso}})_{\text{cana N}}} \right] \times 100 \quad [\text{E4}]$$

Na equação 04, a %Ndffix é a porcentagem do N derivado da fixação; o %  $A^{15}\text{N}_{\text{cultura}}$  é a abundância de  $^{15}\text{N}$  na cultura em estudo e o %  $A^{15}\text{N}_{\text{cana N}}$  é a abundância de  $^{15}\text{N}$  na planta controle.

Para calcular a quantidade de N total em  $\text{mg planta}^{-1}$ , foi utilizado o produto dos teores de TN das plantas e da biomassa seca da parte aérea (BSPA) de cada planta avaliada (Equação 05). A posteriori, foi possível obter os valores da quantidade de N derivado fixação (QNdffix) a partir do produto da %Ndffix e QNT das plantas em estudo (Equação 06).

$$\text{QNT} = \frac{\text{N} \times \text{BSPA}}{100} \quad [\text{E5}]$$

$$\text{QNdffix} = \frac{\% \text{ Ndffix} \times \text{QNT}}{100} \quad [\text{E6}]$$

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  $\text{N}_2$  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 07).

$$\% \text{ Ndfsolo} = 100 - \% \text{ Ndffix} \quad [\text{E7}]$$

Para cálculo da quantidade de N derivado do solo (QNdsolo) em  $\text{mg planta}^{-1}$ , foi utilizada a equação 08, no qual a variável QNdsolo foi obtida a partir do produto da %Ndfsolo e QNT das plantas.

$$QN_{\text{dsolo}} = \frac{\%N_{\text{dsolo}} \times QNT}{100} \quad [E8]$$

#### 2.4.6 Teor de nitrogênio foliar

Nas folhas +1 utilizadas para a determinação da abundância do  $^{15}\text{N}$ , foi quantificado o teor de N total. As amostras de folha após secas 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). O N total do material vegetal das folhas 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.

#### 2.5 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados quanto aos critérios da anova e quando necessário foram transformados. Posteriormente os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) em fatorial triplo 5 x 2 x 3 no programa R statistic (RSTUDIO TEAM, 2015; R CORE TEAM, 2019). 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 Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ).

Como critérios para escolha dos modelos de regressão, foram selecionados aqueles que apresentaram maior coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e significância dos parâmetros da regressão até 5 % de probabilidade pelo teste t, bem como os modelos que melhor representaram o fenômeno no programa SigmaPlot 12.0 (SYSTAT SOFTWARE, 2011). Em seguida foram analisadas as médias das variáveis de cada tratamento por meio da estatística descritiva determinando-se a intervalo de confiança.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Metabolismo e nutrição

A adubação nitrogenada e molíbdica quando associadas à inoculação com bactérias diazotróficas apresentaram interação tripla e exerceram efeito significativo ( $p \leq 0,01$ ) sobre a ARN, TNF, TMo, TNH<sub>4</sub> e TNO<sub>3</sub> aos 100 DAG (Tabela 3). Para TN, foi verificado efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) da interação entre doses de nitrogênio e inoculação de bactérias.

**Tabela 03.** Análise de variância para redutase do nitrato (ARN) e teor de nitrogênio da parte aérea, nitrogênio foliar, molibdênio, amônio e nitrato (TN, TNF, TMo, TNH<sub>4</sub><sup>+</sup> e TNO<sub>3</sub><sup>-</sup>) da parte aérea da cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada com e sem aplicação de molibdênio, com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>).

Fator	Valor de F					
	ARN	TN	TNF	TMo	TNH <sub>4</sub>	TNO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
N	30,24*	4,96*	4,92*	3,47**	11,11*	3,24*
Mo	0,02 <sup>ns</sup>	1,49 <sup>ns</sup>	5,51**	321,1*	1,13 <sup>ns</sup>	5,58**
Bac	2,73 <sup>ns</sup>	1,12 <sup>ns</sup>	3,57**	1,45 <sup>ns</sup>	4,09*	1,98 <sup>ns</sup>
N x Mo	0,25 <sup>ns</sup>	0,48 <sup>ns</sup>	0,76 <sup>ns</sup>	3,28**	2,55**	3,27*
N x Bac	1,87 <sup>ns</sup>	2,35**	1,24 <sup>ns</sup>	1,91**	5,74*	3,72*
Mo x Bac	0,84 <sup>ns</sup>	0,37 <sup>ns</sup>	1,03 <sup>ns</sup>	1,46 <sup>ns</sup>	4,66*	2,56 <sup>ns</sup>
N x Mo x Bac	3,25*	1,08 <sup>ns</sup>	1,94**	1,92**	9,02*	3,67*
CV (%)	2,95	3,65	10,26	7,07	19,62	4,0

<sup>ns</sup> não significativo, \* e \*\* significativo a 1 e 5 % de probabilidade respectivamente pelo teste F.

Fonte: R statistic, 2019.

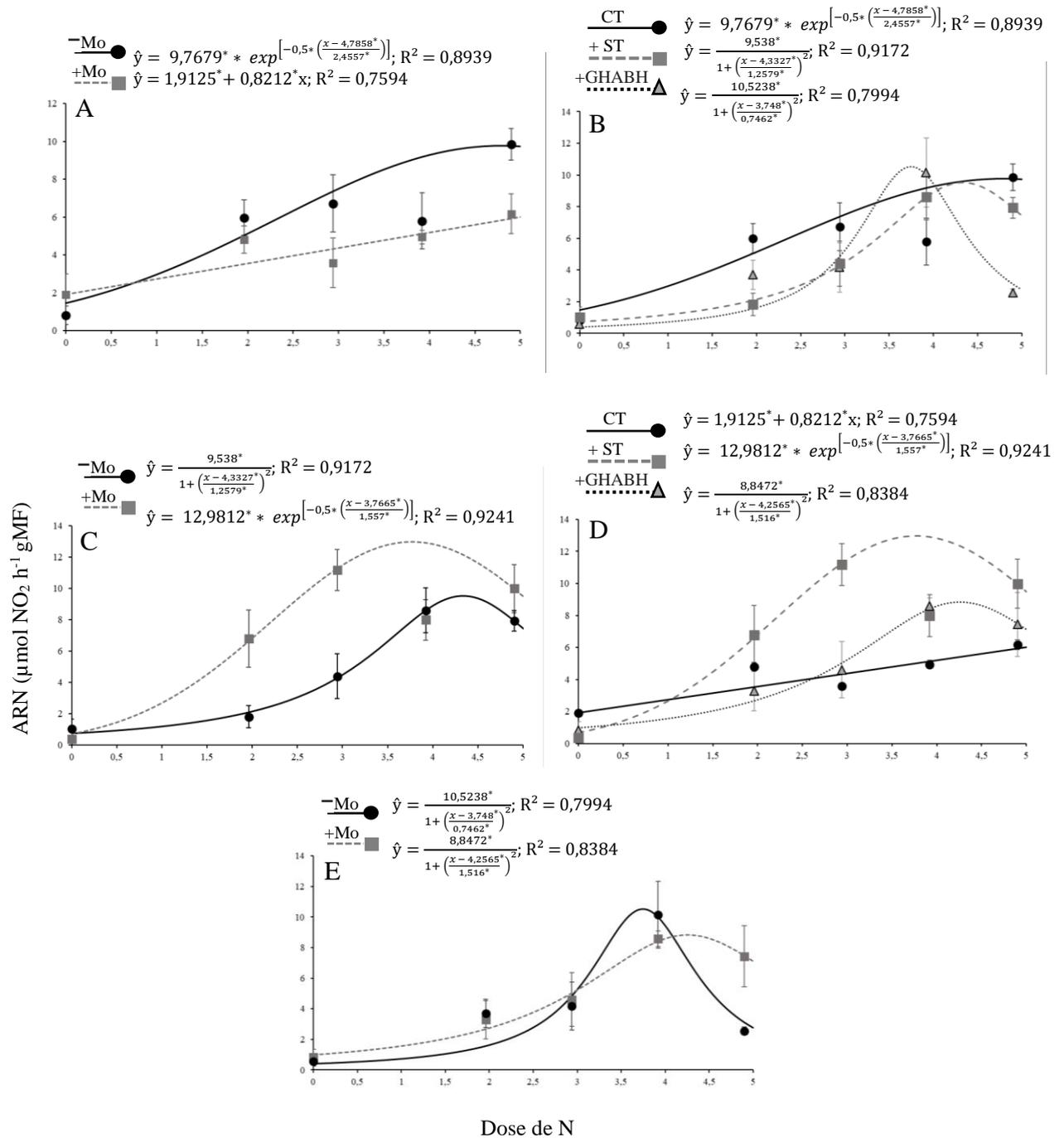
##### 3.1.1 Atividade da enzima redutase do nitrato

Os dados sem a aplicação de Mo se ajustaram ao modelo de pico, no qual é possível identificar que a partir da dose de fertilizante nitrogenado 3 g vaso<sup>-1</sup> a ARN atingiu máxima atividade (Figuras 11 A, B, C, D e E). Para os tratamentos em que ocorreram a aplicação do Mo e não foram inoculados (Figura 11 A), os dados se ajustaram ao modelo linear crescente, mas os tratamentos em que ocorreram a aplicação do adubo molíbdico e inoculação com bactérias, tiveram um comportamento de pico (Figura 11 C e D).

A redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> absorvido avaliada pela ARN foi menor na presença das bactérias quando não se utilizou o Mo até a dose de 3,3 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 04 B). Em doses mais elevadas houve pico de 9,53 μmol NO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> gMF na dose de 4,3 g vaso<sup>-1</sup> e 10,48 μmol NO<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> gMF na dose 3,8 g vaso<sup>-1</sup> para ST e GHABH, respectivamente. Contudo, não houve diferença significativa entre os tratamentos inoculado e não inoculado.

Com a aplicação de Mo, só houve efeitos na atividade da enzima quando inoculado (Figura 04 D) apresentando incrementos a partir da dose de 1,1 g vaso<sup>-1</sup> para a ST e 2,7 g vaso<sup>-1</sup> para GHABH.

Para a inoculação da ST houve incremento de 37% no pico de atividade da enzima com uma dose 12,5% menor com a aplicação do micronutriente que passou de 9,53  $\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gMF}$  em dose de N de 4,3 g vaso<sup>-1</sup> para 12,98  $\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gMF}$ , com dose de 3,5 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 04 C). Para a GHABH houve redução da atividade máxima que passou de 10,48 para 8,84  $\mu\text{mol NO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ gMF}$  com dose de 3,7 para 4,3 g vaso<sup>-1</sup> para inoculação e inoculação conjunta a Mo, respectivamente.



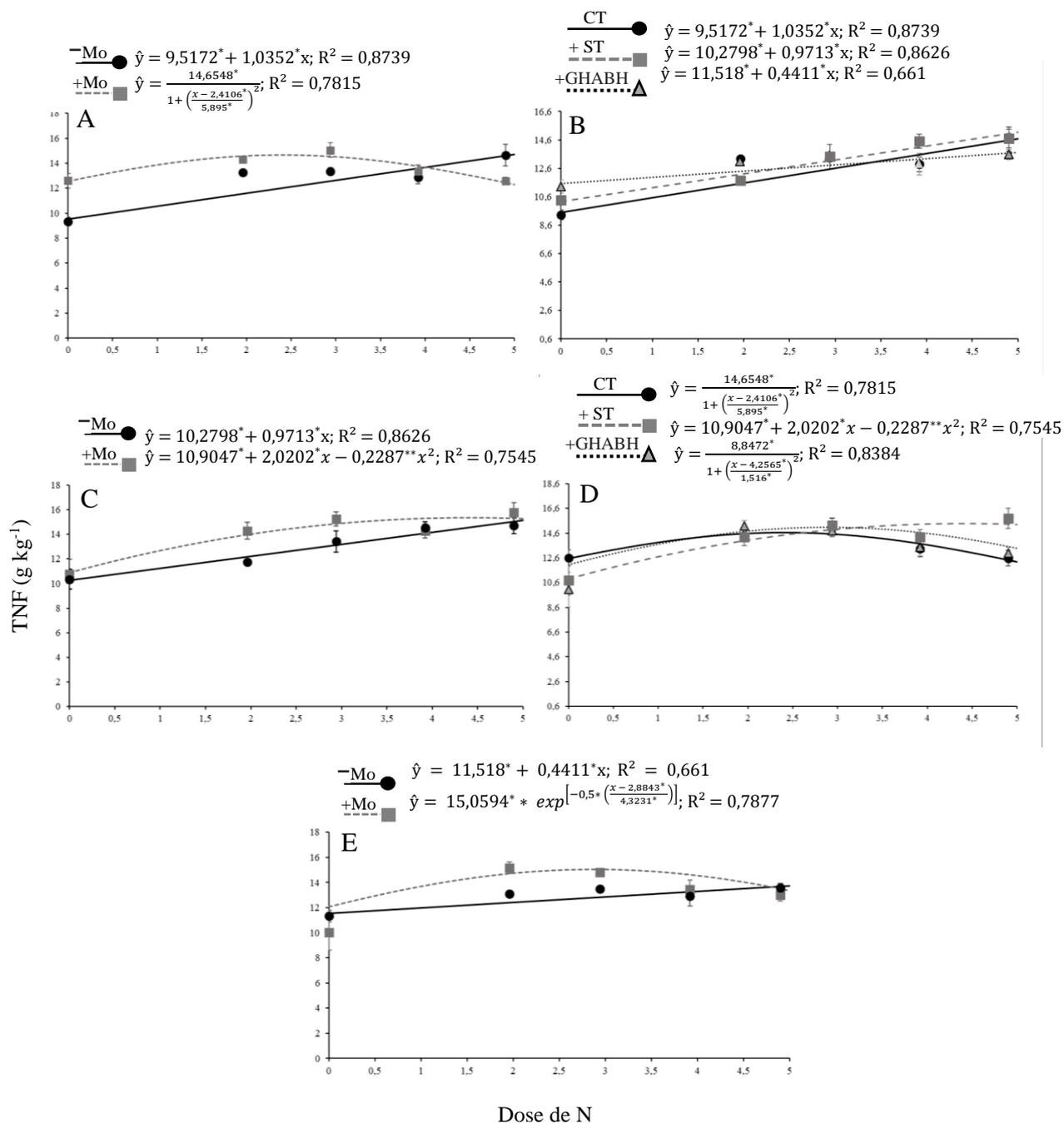
**Figura 04.** Atividade da redutase do nitrato (ARN) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vase}^{-1}$ ): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.1.2 Teor de nitrogênio foliar

Para o TN da folha +1, as curvas sem aplicação de Mo, independentemente da inoculação, se ajustaram ao modelo linear crescente e são apresentados na Figura 05 A, B, C, D e E. Com a aplicação do micronutriente, os dados se ajustaram ao modelo de pico, exceto pelo tratamento com ST que se adequou ao modelo quadrático (Figura 05 C).

Foi observado efeito positivo da inoculação na nutrição nitrogenada da cana planta sem e com a aplicação do Mo (Figura 05 B e D). Quando não inoculado e sem Mo, o TNF sem presença de N é de  $9,51 \text{ g kg}^{-1}$  e aumenta para  $10,27$  e  $11,51 \text{ g kg}^{-1}$  (8,01 e 21,02%) com a inoculação de ST e GHABH, respectivamente. Esses valores passam a  $14,69$ ;  $15,13$  e  $13,72 \text{ g kg}^{-1}$  com a dose mais alta de N, o que corresponde a um incremento de 54,38; 47,24 e 19,14% em relação a dose sem N de cada tratamento.

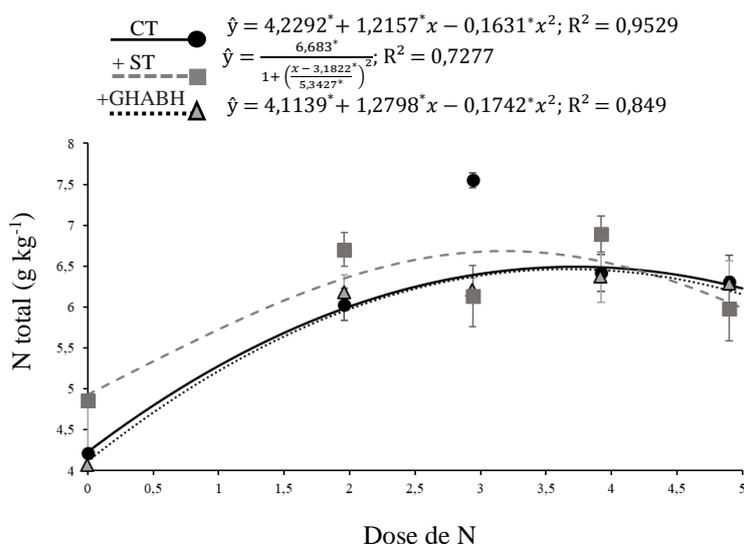
Quando adicionado o Mo (Figura 05 A, B e C) os TNF atingem pico de  $14,65$ ;  $15,36$  e  $15,05 \text{ g kg}^{-1}$  em dose próxima a  $3 \text{ g vaso}^{-1}$ , o que mostra que o Mo incrementa na absorção de N. Ainda, quando não há inoculação e sem aplicação do N, a adubação molíbdica auxilia na maior absorção de N passando de  $9,51$  para  $12,28 \text{ g kg}^{-1}$ .



**Figura 05.** Teor de N foliar (TNF) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.1.3 Teor de nitrogênio total

O teor de N na parte aérea da cana-de-açúcar foi incrementado com a adubação nitrogenada em média 47,63%, passando de 4,43 g kg<sup>-1</sup> na dose 0 g vaso<sup>-1</sup> para 6,54 g kg<sup>-1</sup> na dose 3,2 g vaso<sup>-1</sup>, ponto em ocorreu maior acúmulo na planta (Figura 06). As curvas se ajustaram ao modelo quadrático, com exceção do tratamento inoculado com ST que se ajustaram ao modelo de sino.



**Figura 06.** Teor de N total (N total) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>). CT: Controle; N: Nitrogênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

Nas plantas inoculadas com GHABH não houve diferença no teor de N quando comparada às plantas não inoculadas. Mas, quando houve inoculação da bactéria ST na cana-de-açúcar, esta apresentou maiores teores de N até a dose de 4,3 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 06).

O efeito positivo máximo na variável com a inoculação da ST ocorreu na dose de 3,2 g vaso<sup>-1</sup>. Nesta dose, a combinação da inoculação com o fertilizante nitrogenado apresentou incremento no valor de 6,68 g kg<sup>-1</sup>, representando um incremento de 58,29% do TN frente à inoculação. Em doses mais elevadas, a bactéria promoveu decréscimo da variável.

Na ausência de N, a bactéria ST promoveu incrementos de 16,64% em relação ao tratamento sem inoculante e conforme foi incrementada a dose de N, esses ganhos foram reduzidos até 3,62% no valor máximo das curvas (Figura 06).

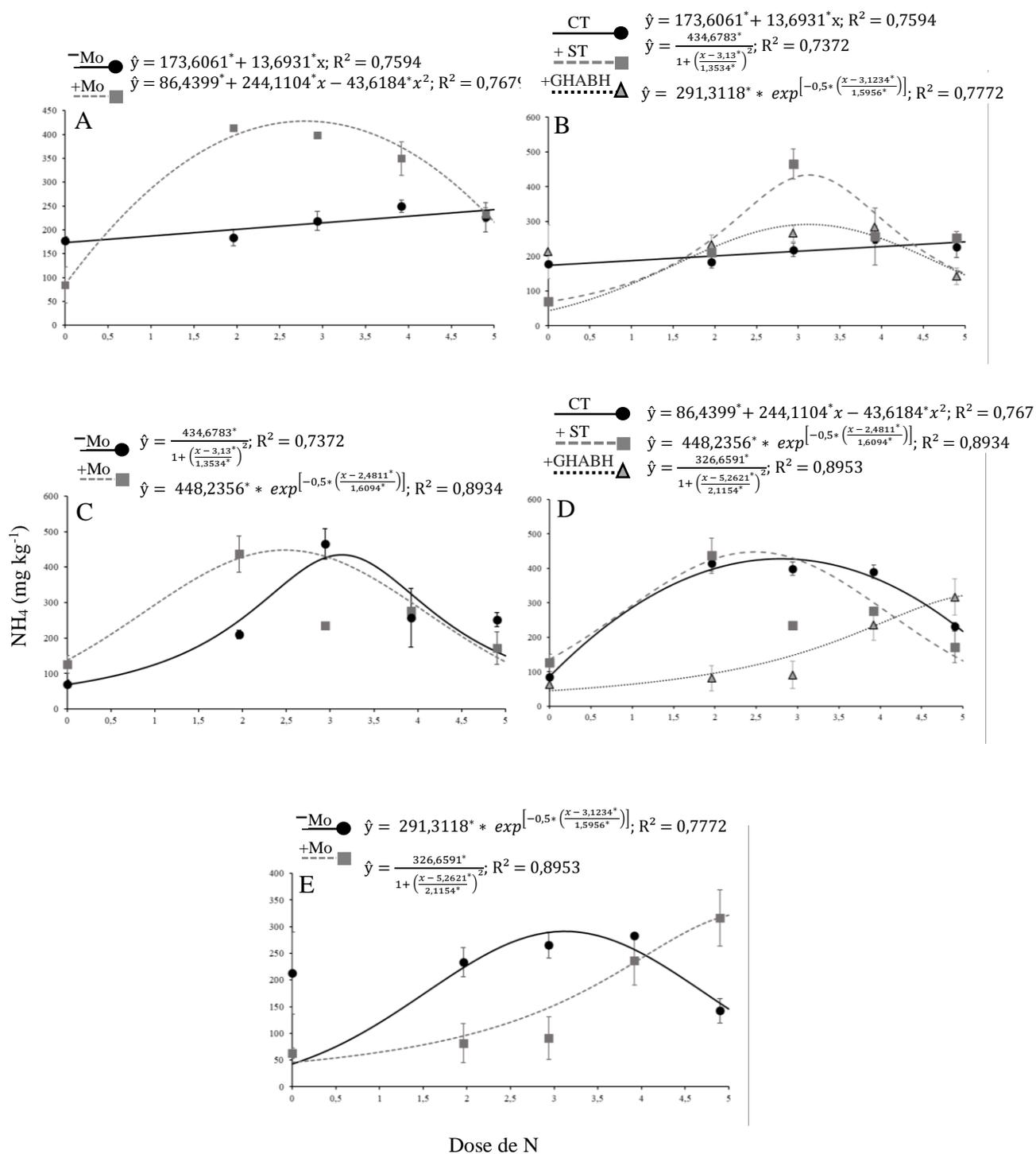
### 3.1.4 Teor de amônio

Os  $\text{TNH}_4^+$  na cana planta apresentaram modelo de pico quando inoculados, independentemente da aplicação ou não do Mo (Figura 07 C e E). No entanto, quando não há inoculação e nem aplicação de Mo, os dados se ajustaram ao modelo linear crescente, enquanto que com Mo se ajustaram ao modelo quadrático (Figura 07 A).

É observado que o  $\text{TNH}_4^+$  sem a presença do Mo e N são mais elevados que os teores com o Mo, apresentando valores médios de  $173,6 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $86,43 \text{ mg kg}^{-1}$  respectivamente (Figura 07 A). Contudo, com o incremento das doses de N os teores passam a ser mais elevados na presença do micronutriente a partir da dose de  $0,5 \text{ g vaso}^{-1}$ . Em doses mais elevadas, os  $\text{TNH}_4^+$  atingem pico de  $427,98 \text{ mg kg}^{-1}$  para a dose de  $2,8 \text{ g vaso}^{-1}$ , o que representa um incremento de 395% em relação a dose 0 de N. Sem o Mo, nesta mesma dose, os  $\text{TNH}_4^+$  apresentam valores de  $242,07 \text{ mg kg}^{-1}$ , o que representa 76,80% e mostra a importância da aplicação do micronutriente. Ainda, na mesma Figura, doses elevadas de N reduzem o  $\text{TNH}_4^+$  na presença do Mo nos tecidos de parte aérea chegando a valores de  $216,53 \text{ mg kg}^{-1}$  na dose mais elevada de N.

É possível notar que apenas a inoculação com ST em associação com o adubo nitrogenado já eleva os  $\text{TNH}_4^+$  à  $434,46 \text{ mg kg}^{-1}$  na dose de  $3,1 \text{ g vaso}^{-1}$  (Figura 07 C). Contudo, com a aplicação de Mo, o tratamento atinge valores de  $448,204 \text{ mg kg}^{-1}$  de  $\text{TNH}_4^+$  em dose de  $2,5 \text{ g vaso}^{-1}$ . É possível notar que o resultado desta dose apresenta relação com os teores de N mais elevados com a inoculação dessa bactéria apresentados na Figura 06 e com a maior atividade da ARN com aplicação do micronutriente e inoculação apresentada na Figura 04 C, mostrando como a inoculação e a aplicação do Mo podem influenciar vários parâmetros avaliados.

A inoculação da GHABH eleva os teores de amônio apenas quando associado ao N (Figura 07 E). Este comportamento ocorre até a dose de  $3,1 \text{ g vaso}^{-1}$ , que após isso é decrescente. A introdução do micronutriente Mo, neste caso, reduz os  $\text{TNH}_4^+$ , só atingindo valores mais elevados da variável a partir  $4 \text{ g vaso}^{-1}$  (Figura 07 E).



**Figura 07.** Teor de amônio (TNH<sub>4</sub><sup>+</sup>) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.1.5 Teor de nitrato

Os  $\text{TNO}_3^-$  na cana planta apresentaram modelo de pico para o tratamento controle e os tratamentos em que foi aplicado Mo (Figura 08 A, B, C, D e E), exceto quando apenas inoculado, em que os dados se adequaram ao modelo quadrático (Figura 08 C e E).

Quando não há inoculação, os teores de  $\text{TNO}_3^-$  com a aplicação de Mo foram mais elevados e sem N o micronutriente incrementou 251,29% a variável em relação à não aplicação do micronutriente (Figura 08 A). Com o aumento das doses de N, os  $\text{TNO}_3^-$  foram incrementados até a dose de  $2,1 \text{ g vaso}^{-1}$ , no qual em doses mais elevadas, os valores para essa variável foram reduzidos.

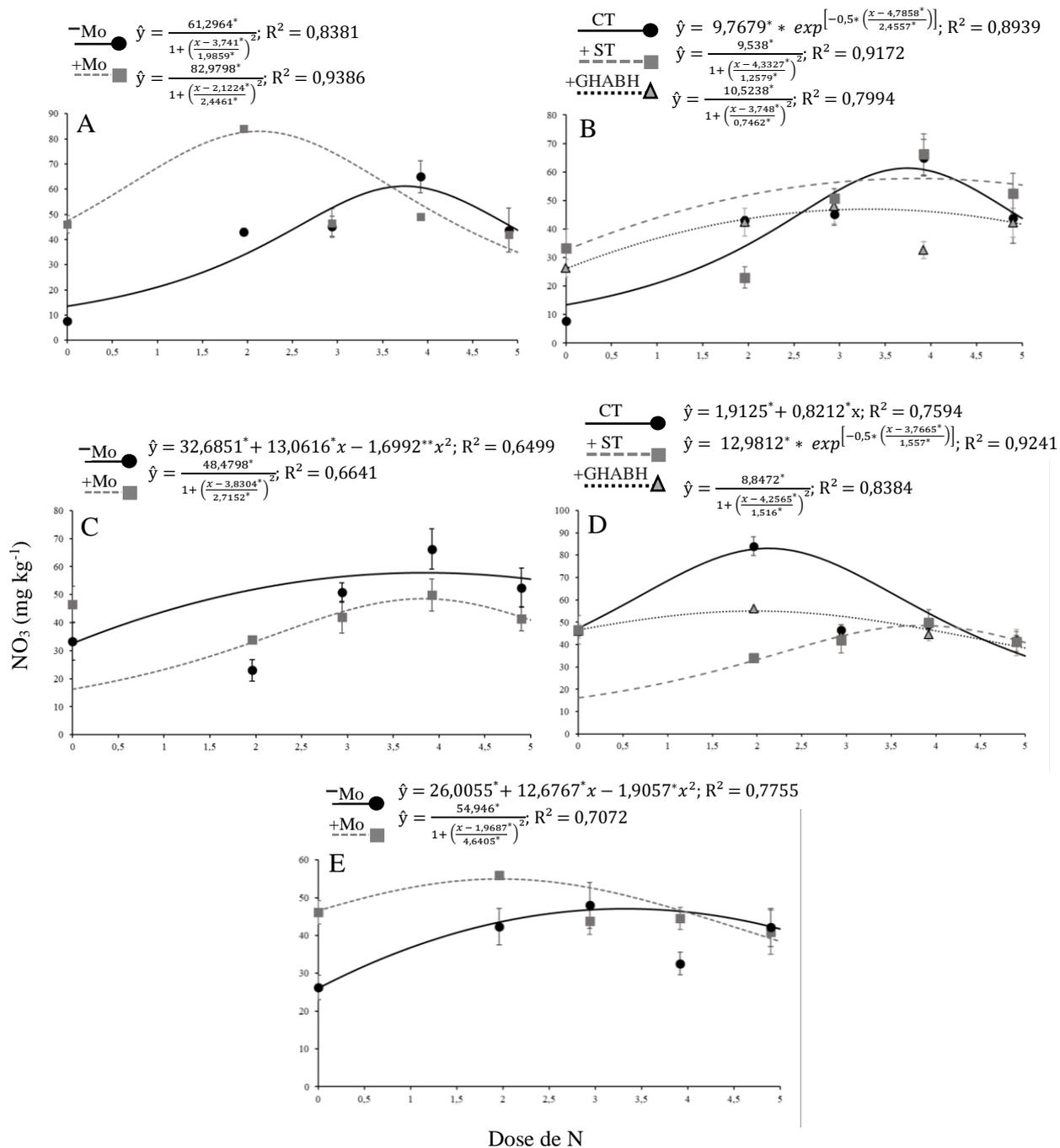
Podemos afirmar que com aplicação de Mo e sem a inoculação ocorreu um acúmulo no  $\text{TNO}_3^-$ , pois a ARN apresentou baixa atividade na presença do Mo (Figura 04 A), ou seja, a planta passou a acumular mais N na forma de nitrato. Apesar disso, o Mo também auxiliou a absorção na forma de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 07 A).

Quando houve inoculação com a ST, os dados da variável estudada foram menores com a aplicação de Mo, com redução média de 68% em função das doses de N (Figura 08 B). Esse resultado, corrobora com os  $\text{TNH}_4^+$  que foram mais elevados até doses próximas à  $3,1 \text{ g vaso}^{-1}$  (Figura 07 C) e com a ARN que foram mais elevados até a dose de  $3,5 \text{ g vaso}^{-1}$  (Figura 04 C).

Portanto, podemos considerar que a aplicação do micronutriente associado a inoculação proporcionou uma melhor utilização do N na planta, no qual o nitrato passou a ser convertido na forma de amônio, uma vez que os  $\text{TNO}_3^-$  foram reduzidos, enquanto a atividade da ARN e os  $\text{TNH}_4^+$  foram incrementados.

Com a inoculação da bactéria GHABH, o comportamento da curva com aplicação do micronutriente foi semelhante ao ambiente sem inoculação: Houve incremento do  $\text{TNO}_3^-$  até a dose de  $2,5 \text{ g vaso}^{-1}$ , mas com o incremento das doses de N, houve redução da variável, que apresentou valores semelhantes ao ambiente sem micronutriente (Figura 08 E).

Para a inoculação das bactérias houveram diferenças nos  $\text{TNO}_3^-$  até dose próxima de  $2,6 \text{ g vaso}^{-1}$  e  $3,2 \text{ g vaso}^{-1}$  para ST e GHABH, respectivamente (Figura 08 B). No entanto, o ambiente com inoculação e aplicação do micronutriente apresentou maiores  $\text{TNO}_3^-$  (Figura 08 D) e, quando não houve inoculação apresentou maiores valores médios. Esse resultado corrobora com os dados da ARN que não apresentaram diferença no ambiente sem Mo e inoculação (Figura 04 E) e com os  $\text{TNH}_4^+$  em que houve redução da variável com a aplicação do Mo (Figura 07 E).



**Figura 08.** Teor de  $\text{NO}_3^-$  na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vaso}^{-1}$ ): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

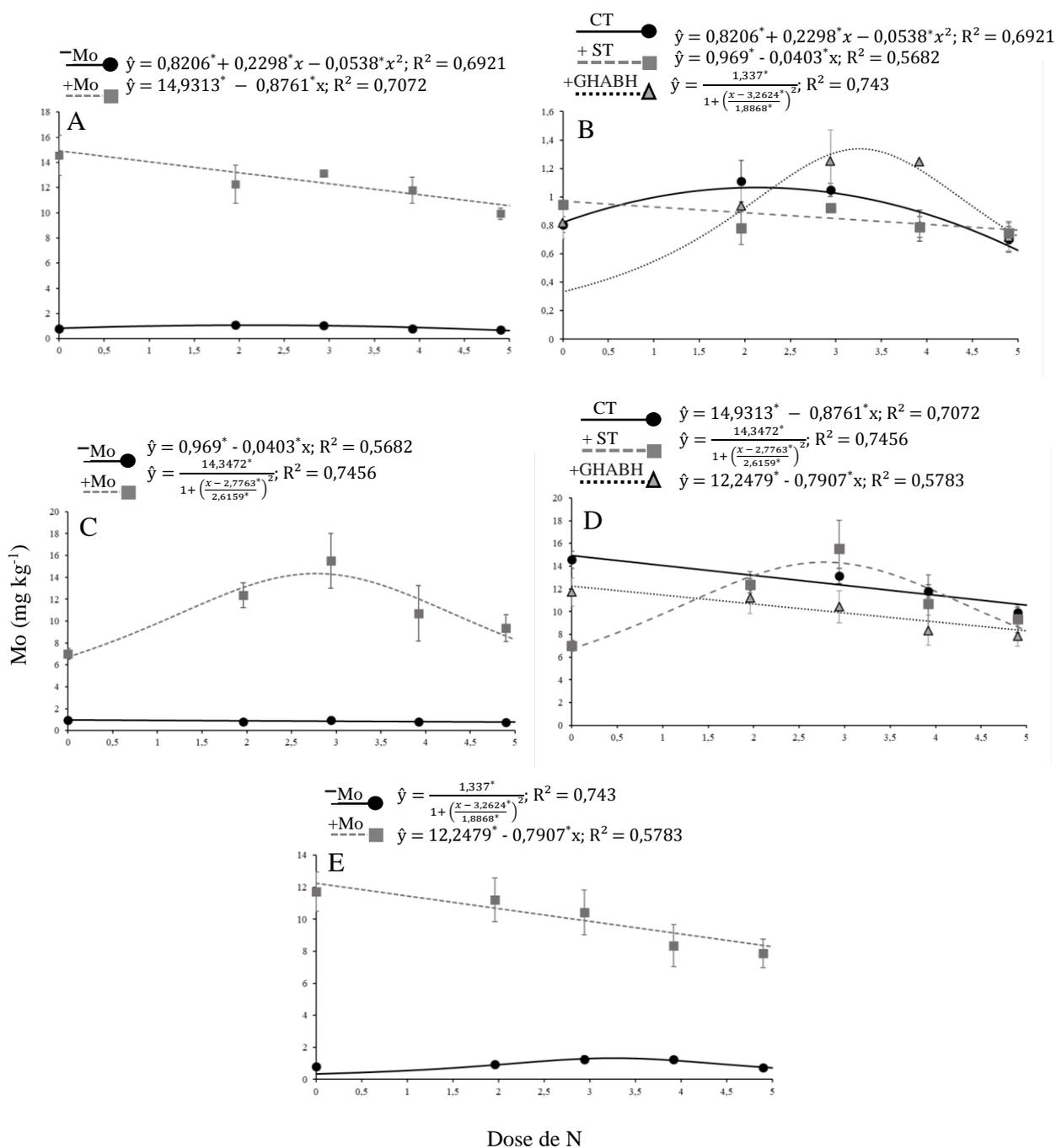
### 3.1.6 Teor de molibdênio total

O tratamento que não utilizou o micronutriente Mo se ajustaram ao modelo quadrático, linear e de pico, respectivamente para sem bac, com ST e com GHABH (Figura 09 B). Quando houve aplicação do micronutriente, os dados se ajustaram ao modelo linear decrescente, exceto quando inoculado com ST (Figura 09 D).

Sem a aplicação de Mo, é observado um comportamento quadrático do nutriente, chegando a  $1,06 \text{ mg kg}^{-1}$  e decaindo para  $0,62 \text{ mg kg}^{-1}$  na dose mais alta de N (Figura 09 A). Quando inoculado com a bactéria ST e são incrementadas as doses de N é possível observar um pico de  $1,34 \text{ mg kg}^{-1}$  na dose  $3,3 \text{ g vaso}^{-1}$  (Figura 09 C). Após, é observado um comportamento decrescente do nutriente, caindo para  $0,72 \text{ mg kg}^{-1}$  na dose mais alta de N. Já a GHABH apresenta pico na dose de  $3,3 \text{ g vaso}^{-1}$  com valor de  $1,33 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mo, apresentando os valores mais elevados da variável (Figura 09 E).

Os teores de Mo aumentam com a adubação molíbdica independente da presença ou ausência da inoculação e reduziram com a adubação nitrogenada (Figura 09 A, C e E). Mas, sem N, é possível perceber que a inoculação das bactérias reduziu o TMo das plantas (Figura 09 D). Contudo, a partir da dose de  $2 \text{ g vaso}^{-1}$ , a bactéria ST começou a apresentar teores mais elevados na faixa de  $13,18 \text{ mg kg}^{-1}$ .

É possível perceber que doses elevadas de N reduzem o TMo nos tecidos de parte aérea chegando a reduzir 70,66; 47,03 e 67,72% quando comparado ao teor mais elevado de Mo para os tratamentos controle, com ST e com GHABH, respectivamente (Figura 09 A, C e E).



**Figura 09.** Teor de Mo na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.2 Fixação biológica de N

Com base nos resultados da análise de variância, observou-se que a interação tripla exerceu efeito significativo ( $p \leq 0,01$ ) sobre todas as variáveis de FBN aos 100 DAG, exceto para abundância  $^{15}\text{N}$ , que apresentou efeito significativo ao nível de  $p \leq 0,05$  para a interação entre N, Mo e Bac (Tabela 04).

**Tabela 04.** Análise de variância para abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$ , quantidade de nitrogênio total, porcentagem de nitrogênio derivado da FBN, quantidade de nitrogênio derivado da FBN, porcentagem de nitrogênio derivado do solo e quantidade de nitrogênio derivado do solo ( $^{15}\text{N}$ , QNT, Ndffix, QNdffix, Ndfsolo e QNdffsolo) para cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada com e sem aplicação de molibdênio, com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vaso}^{-1}$ ).

Fator	Valor de F					
	$^{15}\text{N}$	QNT	Ndffix	QNdffix	Ndfsolo	QNdffsolo
N	83,35*	49.56*	3467.9*	167,43*	3467.97*	142.11*
Mo	2,30 <sup>ns</sup>	0.54 <sup>ns</sup>	4.13**	2,61 <sup>ns</sup>	4.13**	0,001 <sup>ns</sup>
Bac	0,63 <sup>ns</sup>	20.54*	12.71*	27,96*	12.71*	14.77*
N x Mo	0,66 <sup>ns</sup>	17.79*	7.02*	4,30*	7.02*	21.36*
N x Bac	5,02*	7.91*	28.01*	17,52*	28.01*	6.08*
Mo x Bac	0,83 <sup>ns</sup>	16.24*	22.49*	6,39*	22.49*	19.13*
N x Mo x Bac	2,70**	6.56*	17.39*	7,37*	17.39*	6.41*
CV (%)	2,2	5,4	12,34	2,6	2,73	10,26

<sup>ns</sup> não significativo, \* e \*\* significativo a 1 e 5 % de probabilidade respectivamente pelo teste F.

Fonte: R statistic, 2019.

#### 3.2.1 Abundância de átomos de $^{15}\text{N}$

O efeito da interação dos inoculantes com aplicação da adubação molíbdica sob diferentes doses de N, influenciou positivamente na contribuição da FBN da cana-de-açúcar aos 100 DAG. Isso ocorreu devido à aplicação de Mo apresentar uma menor abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  em seus tecidos quando comparado aos tratamentos em que o micronutriente não foi aplicado (Figura 10 E e D).

O comportamento da concentração de átomos de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos da cana-de-açúcar em relação a diferentes doses de N se enquadraram em equações exponenciais e quadráticas que seguiram uma tendência no aumento de átomos de  $^{15}\text{N}$  na planta à medida que foram elevadas as doses de N (Figura 9 A, B, C, D e E). Fica evidente que altas doses de N podem reduzir a eficiência e inviabilizar a contribuição de N via bactérias promotoras de crescimento de plantas pelo processo da FBN.

Sem a inoculação, a aplicação do Mo na dose 0 de N promoveu um incremento de 18,43 % na abundância de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos da cana-de-açúcar (Figura 10 A). A adição do Mo sem

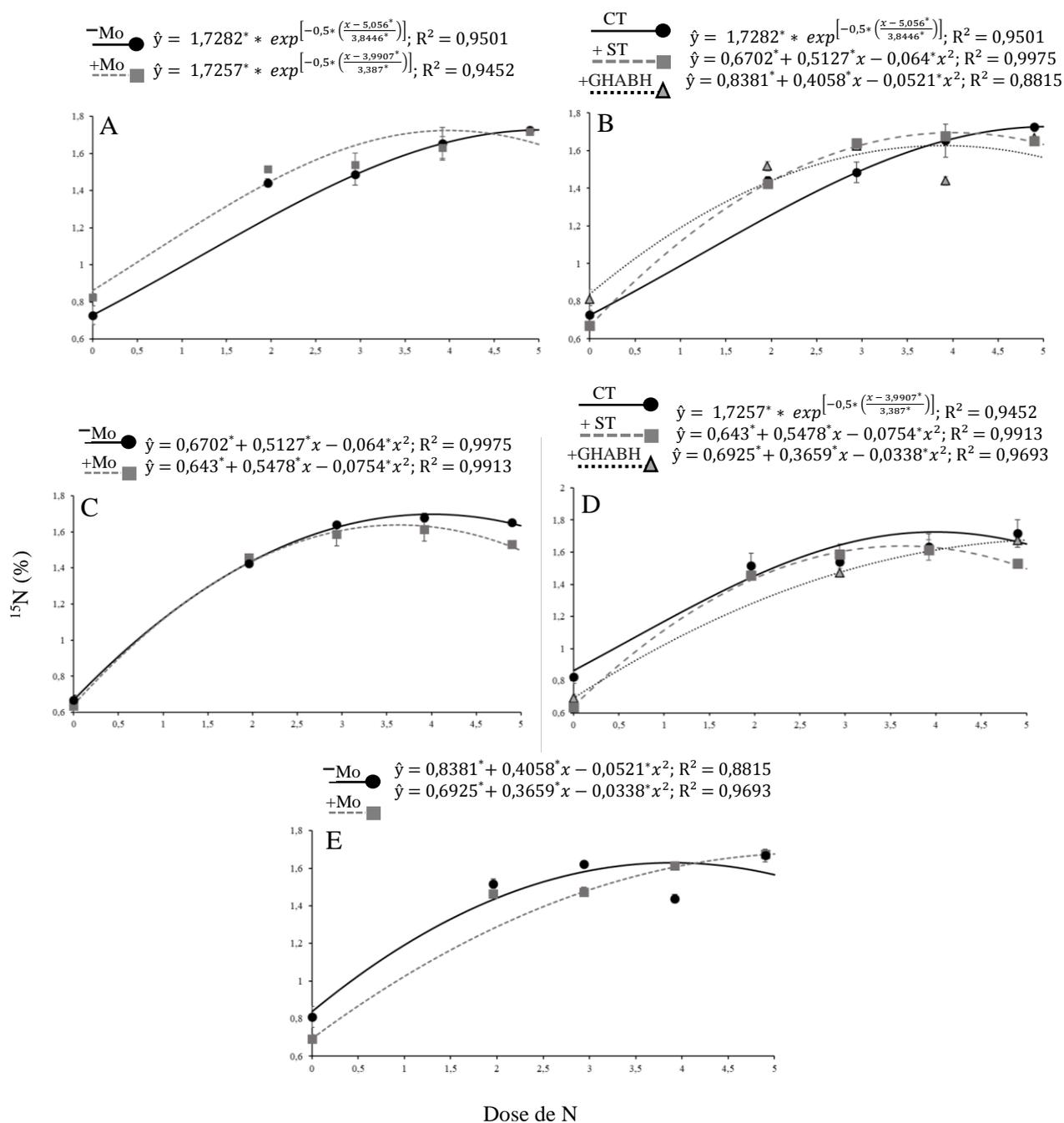
inoculação faz com que, independente da dose de N, a quantidade de  $^{15}\text{N}$  seja elevada nas folhas. apesar disso houve alta entrada de  $\text{TNH}_4^+$  com a aplicação do micronutriente (Figura 07 A). Neste mesmo ambiente houve baixa atividade da ARN (Figura 04 A) e, conseqüentemente acúmulo de  $\text{TNO}_3^-$  (Figura 08 A), mostrando que a função do Mo vai além da nitrogenase da bactéria e ARN da planta.

Quando se utiliza inoculantes com bactérias fixadoras de N em conjunto a adubação molíbdica, a atuação do Mo na nitrogenase faz com que haja uma maior eficiência da FBN na cultura da cana-de-açúcar, como visto nas Figuras 10 D e E. Os tratamentos que receberam Mo na presença da bactéria GHABH apresentaram uma menor concentração de  $^{15}\text{N}$  que os tratamentos sem Mo (Figura 10 E), o que sugere maior FBN.

Foi possível observar que em doses altas de N ( $4,9 \text{ g vaso}^{-1}$ ) há uma inibição da atividade da bactéria havendo um aumento na concentração de átomos de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos da cana-de-açúcar (Figura 10 E), restando apenas a contribuição do Mo na redutase do nitrato (Figura 04 E).

Para a bactéria ST, esse efeito só foi observado a partir da dose  $2,3 \text{ g vaso}^{-1}$  (Figura 10 C). Para este mesmo tratamento, em doses mais baixas que  $2,3 \text{ g vaso}^{-1}$  foi observada que a aplicação de Mo proporcionou maior atividade da ARN (Figura 04 C), maior incremento do N (Figura 06), maiores TNF (Figura 05 C), maior quantidade de  $\text{TNH}_4^+$  (Figura 07 C), maior quantidade de Mo (Figura 09 C) e menores acúmulos de  $\text{TNO}_3^-$  (Figura 08 C). Este resultado sugere que o Mo, para esta bactéria não atuou na FBN, mas em outros mecanismos de promoção de crescimento da planta, o que nos leva a compreender quais seriam as funções deste micronutriente na planta e que sua importância, vai além da nitrogenase. Por este motivo, com a aplicação do Mo associado à inoculação de ST é possível notar uma maior eficiência na utilização do N pela fonte da adubação.

Na dose mais elevada de N, há uma redução nos átomos de  $^{15}\text{N}$  com a aplicação de Mo de 8,36 % com maior atuação do micronutriente na FBN. Nesta mesma dose, foram observadas reduções nas variáveis de todos os parâmetros avaliados (Figuras 04, 05, 06, 07, 08 e 09 C).



**Figura 10.** Abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  (g vaso $^{-1}$ ): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.2.2 Quantidade de nitrogênio acumulado

A quantidade de N acumulado na cana-de-açúcar foram influenciadas pela aplicação de Mo no solo, pela aplicação de inoculantes na cultura da cana-de-açúcar como também pela combinação desses fatores (Figura 11).

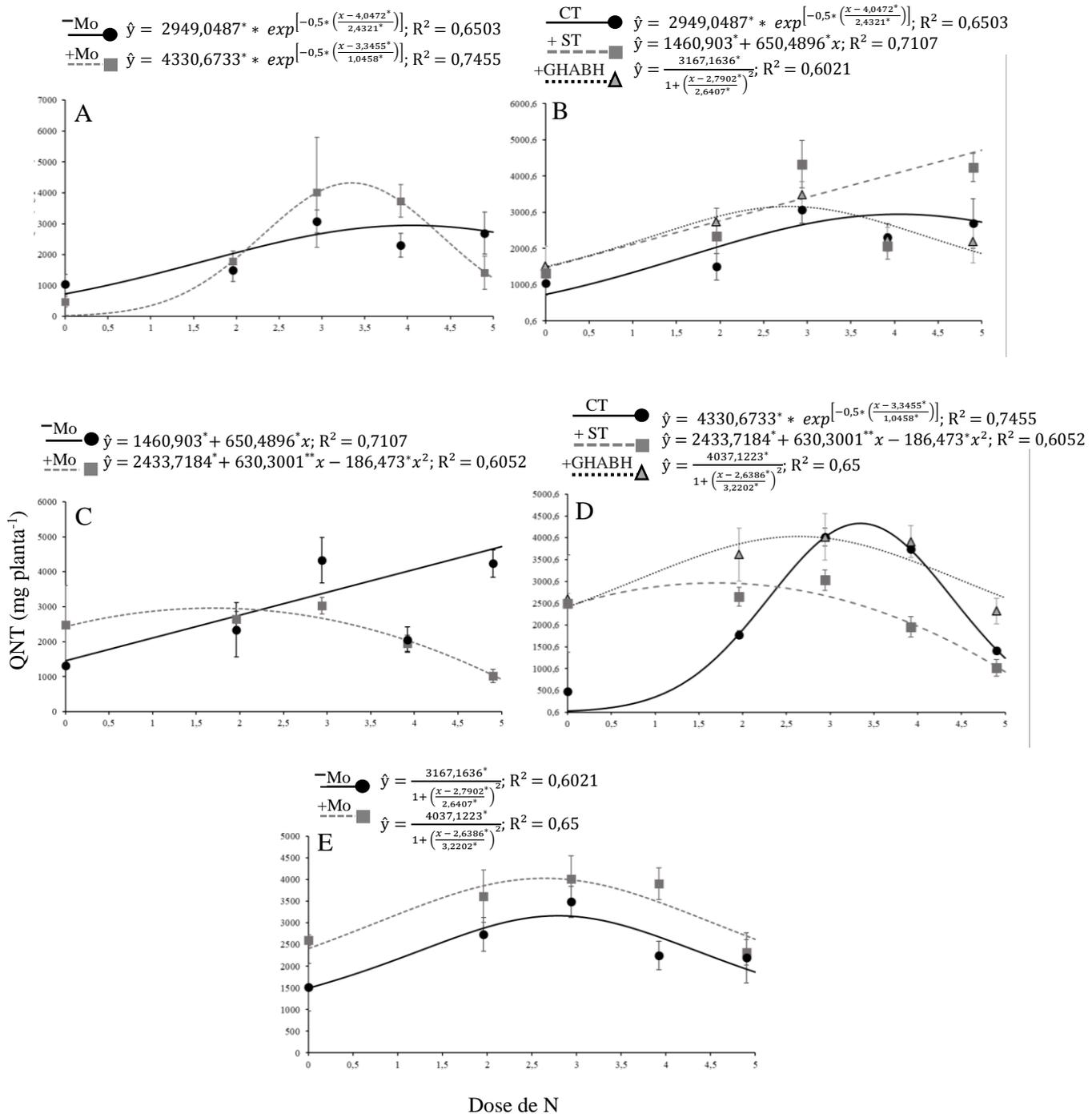
No tratamento que foi utilizado Mo sem aplicação de inoculante (Figura 11 A) foram obtidos maiores acúmulos de N, na parte aérea da planta, com doses superiores a  $1,96 \text{ g vaso}^{-1}$  de N no solo quando comparados ao tratamento sem Mo. O maior acúmulo de N ocorreu com valor de  $4326,58 \text{ mg planta}^{-1}$  e foi estimada em torno de  $3,3 \text{ g vaso}^{-1}$ .

O comportamento do acúmulo de N na planta em relação a diferentes doses de N no solo, em geral, correspondeu a curvas exponenciais, no entanto, foi observado um comportamento linear para o tratamento com inoculação de ST (Figura 11 C). Na figura 11 C o efeito linear que o tratamento com inoculante ST sem a aplicação de Mo apresentou mostra mais uma vez que essa estirpe bacteriana contribuiu para o acúmulo de N na parte aérea mesmo sendo adicionado doses crescentes de fertilizantes nitrogenados. Esse resultado também foi relatado no N total da parte aérea (Figura 06).

A contribuição da FBN pode ser estimada através da abundância de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos da planta. Observando a Figura 10, se torna evidente que doses altas de N no solo diminui a contribuição do N na planta por via da FBN pelo fato de que houve um incremento da abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  nos tecidos da planta. Com o inoculante ST sem Mo e com diferentes doses de N, a abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  aumentaram (Figura 10 C) diminuindo, conseqüentemente, a contribuição da FBN para o acúmulo de N na planta. No entanto, mesmo com a baixa contribuição da FBN na planta o somatório do N pela FBN e pela absorção do N no solo possibilitou um maior acúmulo desse elemento nos tecidos vegetais.

Para o coquetel GHABH é observado que com a aplicação de Mo, um alto QNT é alcançada variando de  $61,41 \text{ mg planta}^{-1}$  na dose  $0 \text{ g vaso}^{-1}$  de N a  $26,63 \text{ mg planta}^{-1}$  na dose  $3,1 \text{ g vaso}^{-1}$  de N, ao longo de toda a curva (Figura 11 E).

Para esta variável, apenas a inoculação (Figura 11 B) não foi suficiente para elevar o QNT em doses mais baixas que  $3 \text{ g vaso}^{-1}$ . Neste contexto, a inoculação deve estar associada ao micronutriente para apresentar altos valores de QNT, como mostra na Figura 11 D em que baixas doses apresentam QNT médio até o ponto máximo da curva de  $2450,11$  e  $3366,78 \text{ mg planta}^{-1}$  para ST e GHABH, respectivamente.



**Figura 11.** Quantidade de Nitrogênio total (QNT) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

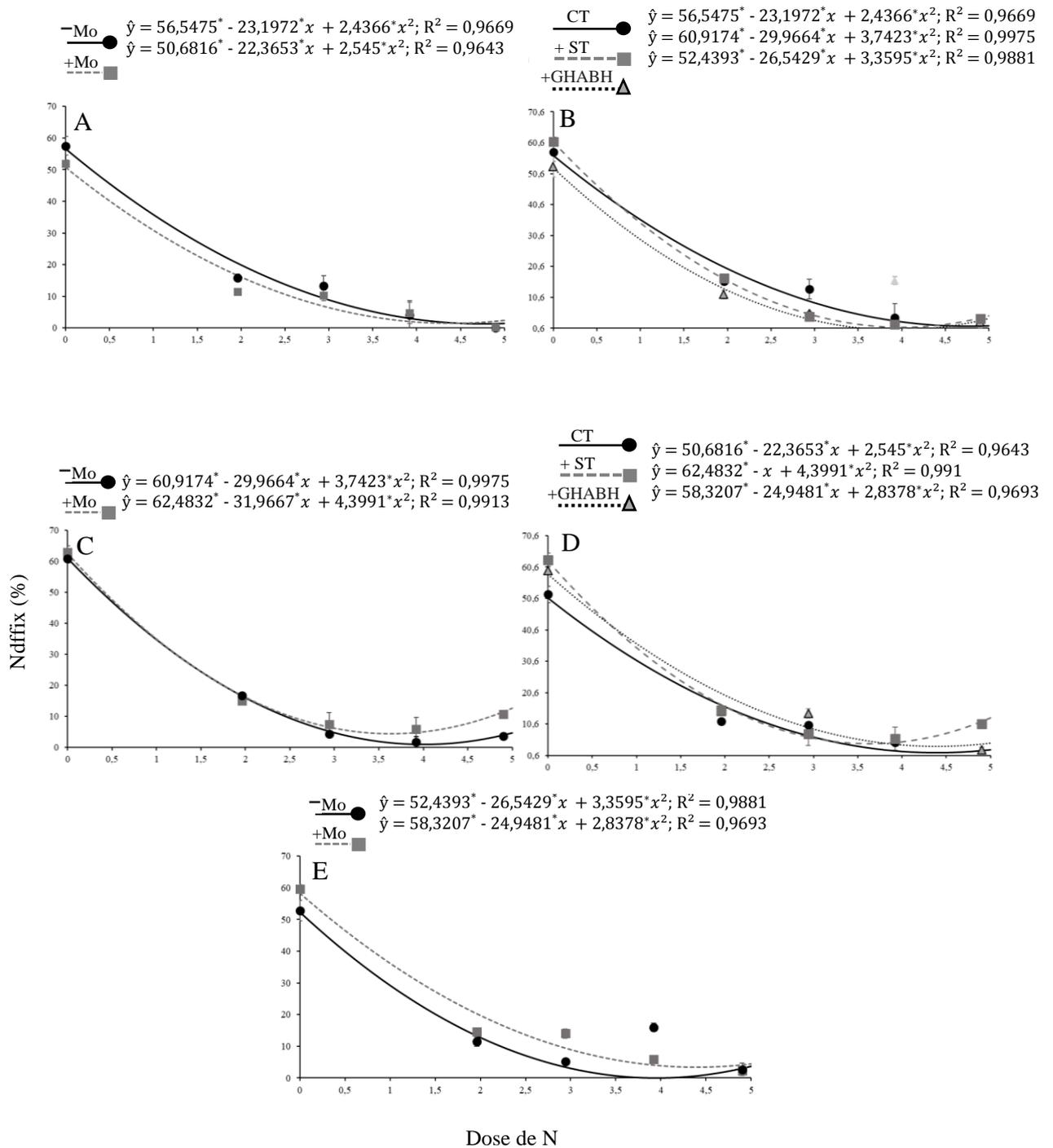
### 3.2.3 Nitrogênio derivado da fixação

O N derivado da fixação (expresso em porcentagem) foi influenciado pela aplicação da inoculação das estirpes bacteriana na cana-de-açúcar como também da aplicação do Mo no solo (Figura 12). Em todos os casos, ocorreu um efeito decrescente da contribuição do N derivado da fixação na planta à medida que houve o acréscimo de doses de N ao solo (Figura 12).

Observando o efeito dos diferentes inoculantes é possível identificar que a contribuição na fixação do N se comportou de forma diferente quando foi utilizada a adubação molíbdica (Figura C, D e E). Para a bactéria ST não houve diferença para a aplicação do micronutriente até a dose de 2,2 g vaso<sup>-1</sup>, no qual a partir deste momento houveram incrementos de até 171,97% na dose mais alta de N, o que representa 8% no Ndffix (Figura 12 C).

Para a GHABH o comportamento foi diferente, apresentando efeitos da aplicação do micronutriente a partir da dose 0 até as doses mais elevadas de N (Figura 12 E). Ainda, independente do inoculantes, é possível notar que os efeitos do adubo molíbdico são maiores em doses mais baixas quando associado à inoculação (Figura 12 D).

A contribuição da FBN atingiu percentuais superiores a 60% quando não se aplicou doses de N, como visto na Figuras 12 B, C, D e E. Nas doses de N superiores a 1,96 g vaso<sup>-1</sup> os percentuais do N derivado do ar foram inferiores a 20%, mostrando o efeito direto da adubação nitrogenada sobre a contribuição da FBN na cana-de-açúcar.



**Figura 12.** Porcentagem de nitrogênio derivado da fixação (Nddfix) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

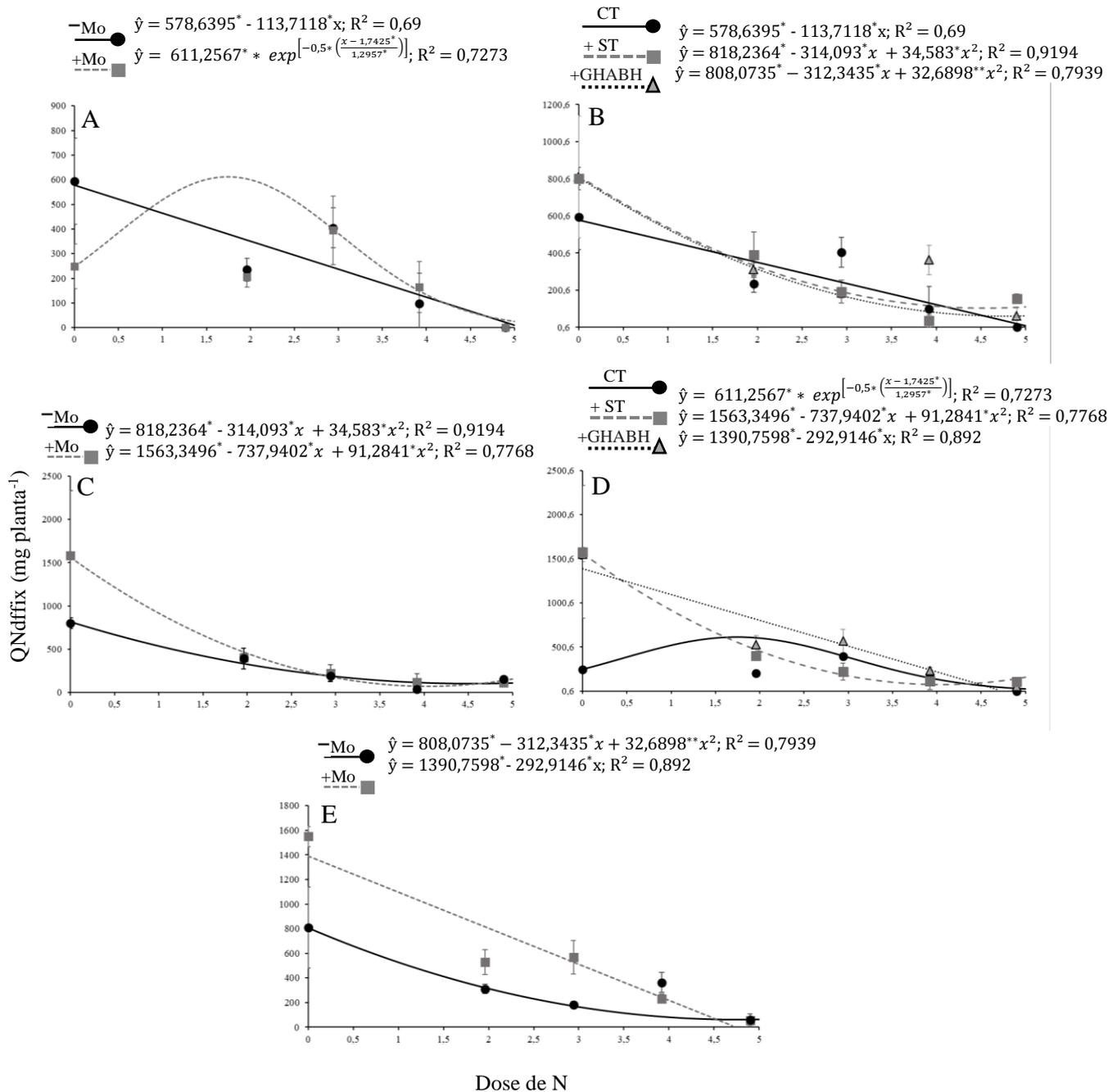
### 3.2.4 Quantidade de nitrogênio derivado da fixação

A quantidade de N derivado da fixação, na grande maioria, segue o mesmo comportamento decrescente (Figura 13) que foi visto no N derivado da fixação biológica (Figura 12). As curvas se ajustaram em modelos lineares (Figura 13 A, B, D e E), polinomial quadrática (Figura 13 B, C, D e E) e exponencial (Figura 13 A e D).

A contribuição na quantidade de N derivado da fixação com a inoculação na dose 0 g vaso<sup>-1</sup> de N atingiu incrementos de 41,4 % e 39,64 % para as bactérias ST e GHABH (Figura 13 B). Contudo, com a introdução do Mo associada à inoculação esses incrementos passaram a ser 170,18 % e 140,35 % (Figura 13 D e E).

Independente do inoculante, a associação com o Mo promoveu valores superiores a 1500 mg planta<sup>-1</sup> de N (Figura 13 D) na dose de maior pico. Contudo, a partir da dose 3,5 g vaso<sup>-1</sup> os valores decresceram a valores próximos de 72,13 mg planta<sup>-1</sup> de N para a ST e chegou a 0 mg planta<sup>-1</sup> para o conjunto de bactérias na dose 4,8 g vaso<sup>-1</sup>.

Em relação ao efeito da inoculação associada ao Mo tiveram a mesma condição vista nos parâmetros anteriores, no qual as estirpes bacterianas obtiveram maiores contribuições em doses baixas de N e com a aplicação de Mo. A aplicação isolada dos fatores não respondeu positivamente para obter uma boa eficiência na FBN.

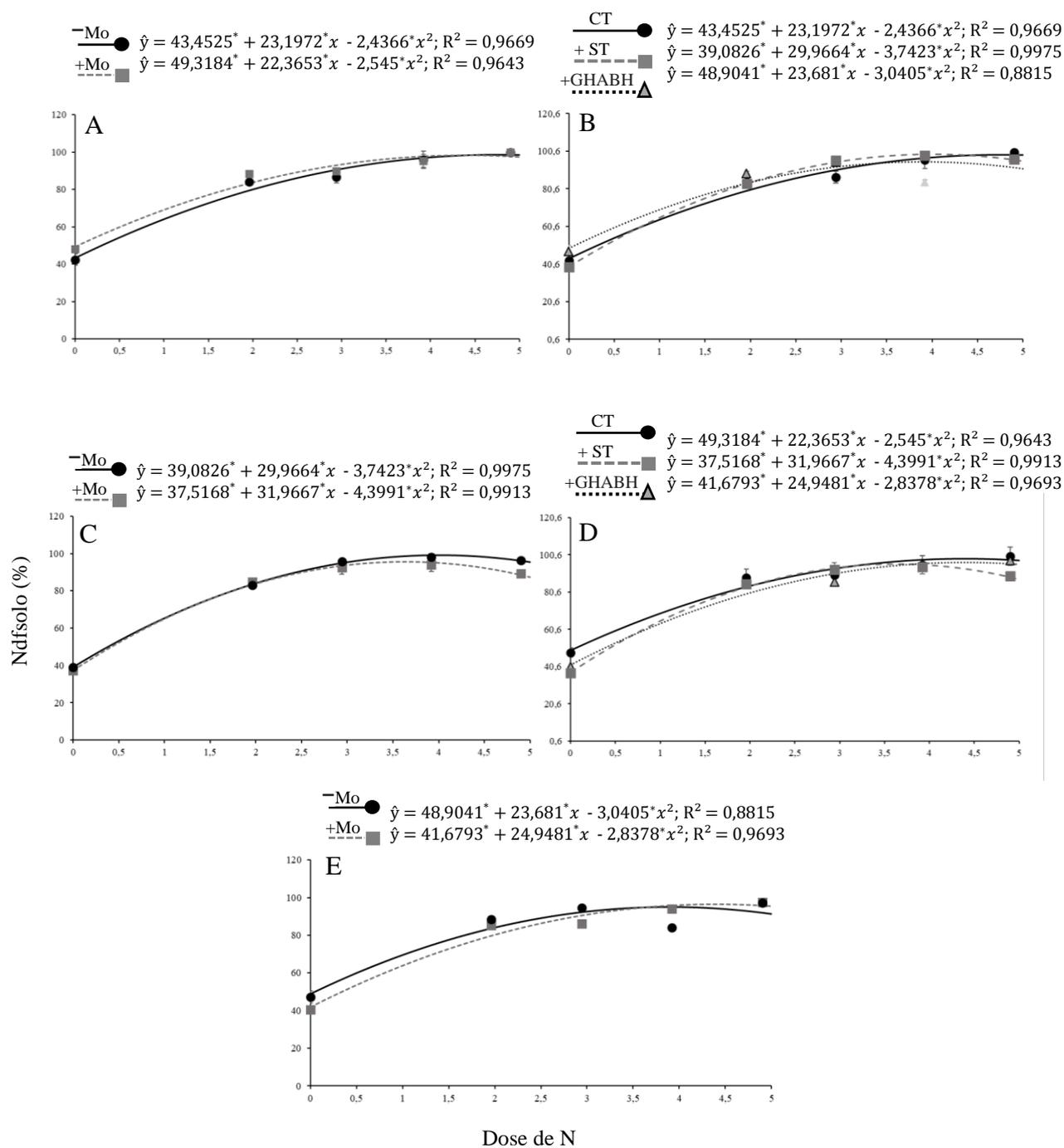


**Figura 13.** Quantidade de Nitrogênio derivado da FBN (QNddfix) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.2.5 Nitrogênio derivado do solo

O N derivado do solo foi inversamente proporcional ao N derivado da FBN quando levam em consideração as diferentes doses de N. À medida que aumenta a dose há um acréscimo no percentual do uso do N do solo pela cana-de-açúcar, mostrando assim uma afinidade com a adubação nitrogenada (Figura 14). O comportamento no N derivado do solo na planta foi ajustado, significativamente, a curvas polinomiais quadráticas com  $R^2$  superiores a 0,88 e chegando a atingir  $R^2$  0,99.

O menor percentual de N derivado do solo foi inferior a 50% na dose zero, a qual prevaleceu à contribuição de N pela FBN. Com a maior dose ( $4,9 \text{ g vaso}^{-1}$ ) foi possível observar uma contribuição do N da planta por via do solo, sendo sua contribuição superior a 99% (Figura 14 B), o que mostra que a absorção e contribuição do N do solo é superior à contribuição do N derivado da FBN processo que demanda alta quantidade de energia de ATP.



**Figura 14.** Porcentagem de nitrogênio derivado do solo (Ndfsolo) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.2.6 Quantidade de nitrogênio derivado do solo

A QNdfsolo aos 100 DAG estão representados na Figura 15. Os efeitos observados tiveram comportamentos exponenciais quando sem inoculação, com aplicação de Mo e com inoculação de ST e aplicação de Mo (Figura 15 A e C). Quando apenas inoculado, os dados apresentaram comportamento linear (Figura 15 C) e independente da aplicação de Mo, os dados com inoculação de GHABH apresentaram comportamento quadrático (Figura 15 E).

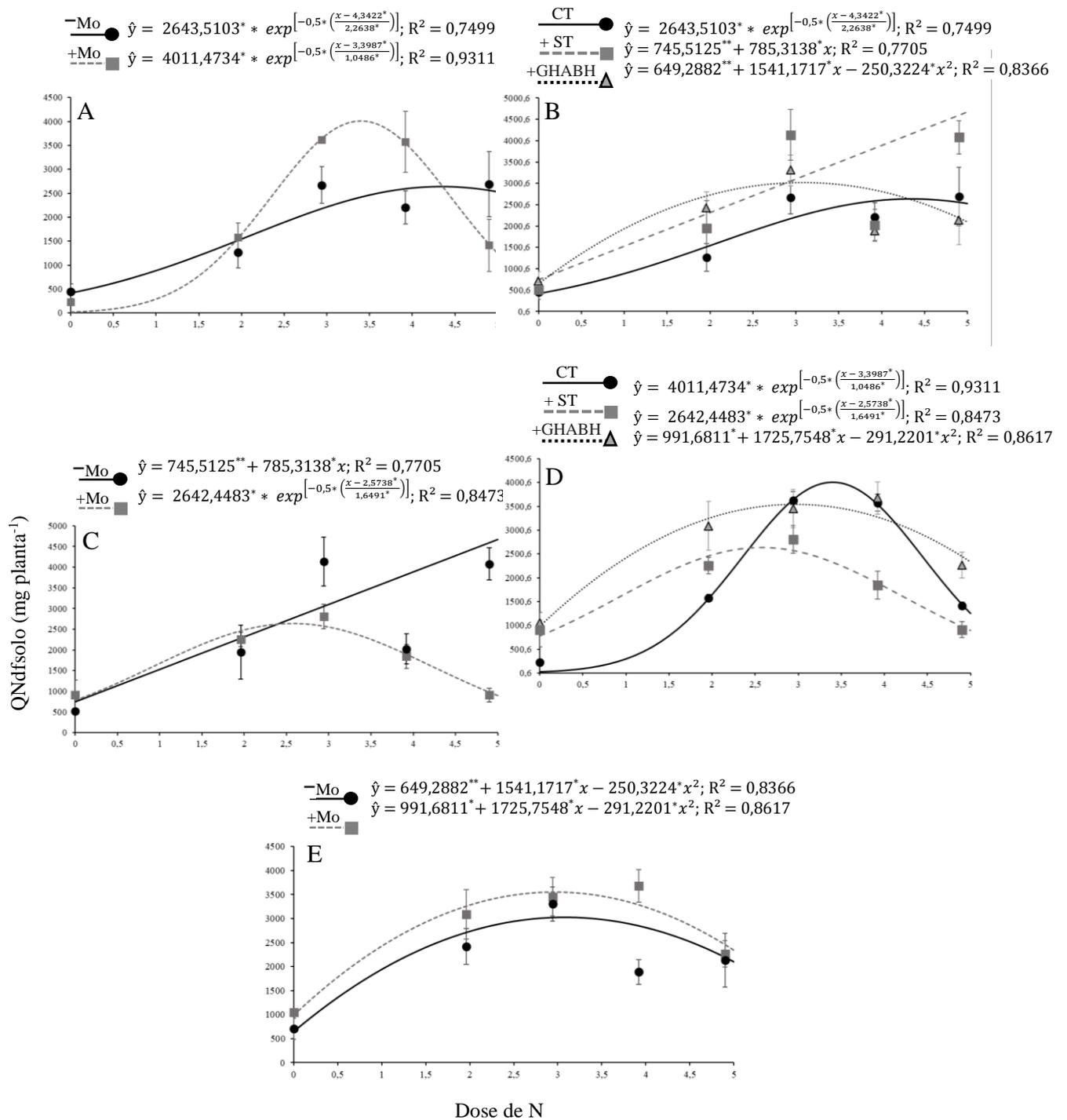
A introdução do Mo doses próximas a  $3,5 \text{ g vaso}^{-1}$  apresentaram pico em de  $4011,47 \text{ mg planta}^{-1}$  o que representa 52% de incremento de incremento no N total. Em doses mais elevadas de N, a contribuição do solo foi reduzida na presença do Mo.

Quando houve inoculação da ST nas plantas, o incremento do fertilizante foi crescente com o pico de  $4672,08 \text{ mg planta}^{-1}$  nas doses mais altas de N, valor 16,48% maior que quando apenas aplicado Mo. Quando a ST está associada ao Mo apresenta comportamento de pico, no qual exhibe máximo de  $2642,11 \text{ mg planta}^{-1}$  na dose de  $2,6 \text{ g vaso}^{-1}$  e depois queda da contribuição do N do solo (Figura 15 C).

Com a inoculação de GHABH os tratamentos, independente da aplicação de Mo, comportamento de incremento até a dose de  $3 \text{ g vaso}^{-1}$ . Nesta dose, o incremento da associação do inoculante com o Mo é 17,48% maior que apenas com inoculação (Figura 15 E). Em geral, valores de incrementos próximos a este são encontrados ao longo de toda a curva.

No ambiente sem Mo, doses maiores que  $3,0 \text{ g vaso}^{-1}$  apresentaram incremento do parâmetro apenas para a bactéria ST (Figura 15 B). Contudo, na presença do Mo os valores para o QNdfsolo são maiores com a inoculação associada ao Mo em doses mais baixas de N (Figura 15 D), o que mostra um auxílio na otimização do uso do fertilizante até doses próximas a  $3 \text{ g vaso}^{-1}$ .

A aplicação do adubo molíbdico apresenta pico máximo de  $4011,47 \text{ g planta}^{-1}$  na dose  $3,4 \text{ g vaso}^{-1}$ . Contudo, sua associação com inoculantes mostra maior eficiência na disponibilidade do QNdfsolo com doses mais baixas de N (Figura 15 D).



**Figura 15.** Quantidade de Nitrogênio derivado do solo (QNdfsolo) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.3 Biometria

Nos parâmetros que correspondem à biometria (biomassa da parte aérea - BioPA, altura - Alt, diâmetro - Dia e Biomassa da raiz - BioR) foram observados efeitos significativos aos 100 e 200 dias das interações (Tabela 05).

A interação tripla foi observada para os parâmetros BioPA e Alt aos 100 dias com efeito significância ( $p \geq 0,01$ ), e para todos os parâmetros aos 200 dias com efeito significativo a ( $p \geq 0,05$ ) (Tabela 06).

**Tabela 05.** Análise de variância para biomassa de parte aérea, altura de planta, diâmetro de colmo e biomassa de raiz (Biopa, Alt, Dia e BioR) para cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada com e sem aplicação de molibdênio, com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 e 200 DAG em função de doses de  $N-NH_4NO_3$  (g vaso<sup>-1</sup>).

Fator	Valor de F						
	100 dias			200 dias			
	Biopa	Alt	Dia	Biopa	Alt	Dia	BioR
N	6,97*	3.65*	0,89 <sup>ns</sup>	22,14*	5,33*	8,78*	7,08*
Mo	2,15 <sup>ns</sup>	2.27 <sup>ns</sup>	4,44**	6,53**	1,29 <sup>ns</sup>	3,37 <sup>ns</sup>	3,99**
Bac	1,58 <sup>ns</sup>	0.35 <sup>ns</sup>	1,61 <sup>ns</sup>	3,16**	0,85 <sup>ns</sup>	2,75 <sup>ns</sup>	1,43 <sup>ns</sup>
N x Mo	3,57*	2.82**	0,77 <sup>ns</sup>	1,29 <sup>ns</sup>	2,59**	2,74**	4,23*
N x Bac	3,25*	1.70 <sup>ns</sup>	0,72 <sup>ns</sup>	3,75*	2,11**	1,56 <sup>ns</sup>	3,33*
Mo x Bac	0,46 <sup>ns</sup>	6.70 <sup>ns</sup>	3,97**	2,94 <sup>ns</sup>	2,79 <sup>ns</sup>	4,44**	1,67 <sup>ns</sup>
N x Mo x Bac	4,42*	4.14*	1,98 <sup>ns</sup>	2,55**	2,05**	2,11**	2,55**
CV (%)	4,96	2,88	20,8	3,59	5,66	3,18	3,65

<sup>ns</sup> não significativo, \*; \*\* e \*\*\* significativo a 1, 5 e 10% de probabilidade respectivamente pelo teste F.  
Fonte: R statistic, 2019.

#### 3.3.1 Biomassa de parte aérea

Os dados de biomassa da parte aérea aos 100 e 200 dias estão representados na figura 17 e 18, respectivamente para os dois ciclos avaliados. Os efeitos observados aos 100 dias tiveram comportamentos, em alguns casos, lineares em relação a diferentes doses de N, como foi visto nos tratamentos que não receberam Mo (Figura 17 A e 18 A) e inoculados com a bactéria ST (Figura 17 C e 18 C).

Para a inoculação com as estirpes GHABH o comportamento dos modelos foi correspondente a regressões polinomial quadrática, sem a aplicação de Mo e exponencial decrescente, com Mo (Figura 17 B). A dose 0 g vaso<sup>-1</sup> de N obteve a máxima produção da biomassa apresentando valores de 14,05 g planta<sup>-1</sup> quando se utilizou Mo em conjunto com as estirpes GHABH (Figura 17 E); para este aspecto o ganho de 20 g foi observado quando consorciava o Mo e a aplicação do inoculante (Figura 17 E).

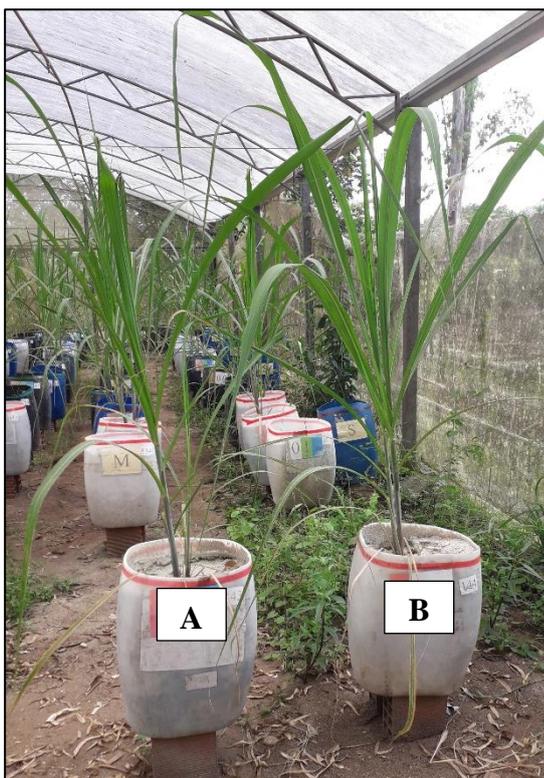
Nos tratamentos em que não houveram a aplicação do Mo, a bactéria perdeu o efeito da promoção do crescimento na produção de biomassa da parte aérea, e com isto, o aumento na dose de N foi o ponto importante para garantir o aumento da produção de biomassa da parte aérea tanto aos 100 dias (Figura 17 C e E) como também aos 200 dias (Figura 17 D e F).

Na figura 18, é possível observar a importância da aplicação do Mo no ciclo inicial (demonstrada por 100 dias) quando se quer potencializar a eficiência da promoção de crescimento das bactérias, visto que nos diferentes períodos avaliados, a contribuição da produção de biomassa foram maiores em tratamentos com bactérias e molibdênio em doses menores que de N (Figura 18 C). No entanto, se não for utilizado a aplicação de Mo, no plantio da cana-de-açúcar, a resposta da produção de biomassa seguirá um comportamento crescente em relação a doses de N (Figura 17 A) ou poderá ser potencializada pelas bactérias promotoras de N (Figura 18 A).

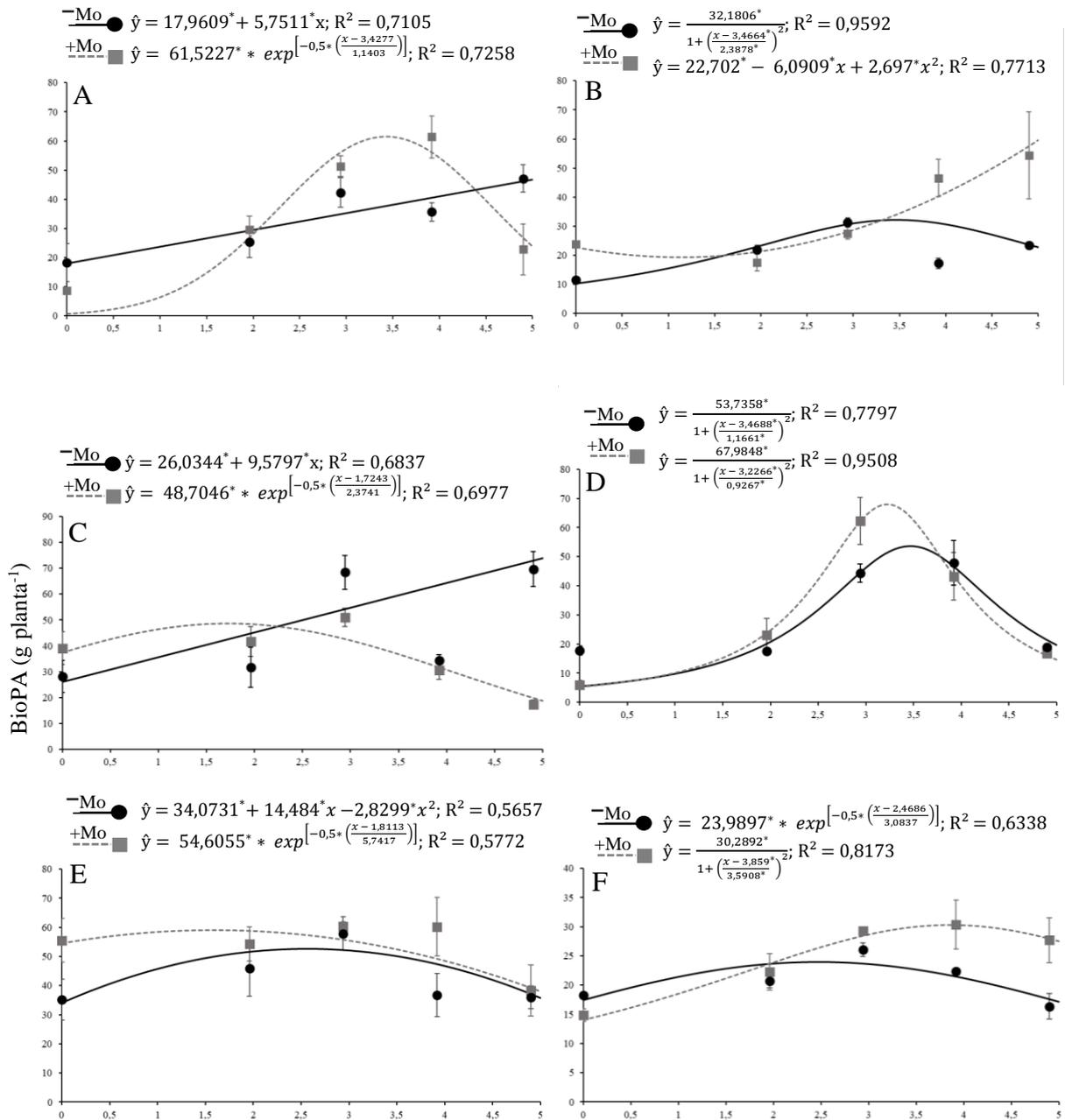
Em geral, aos 100 DAG, doses de 2,0 a 3,0 g vaso<sup>-1</sup> de N quando associado ao Mo e a bactéria apresentaram melhores incrementos semelhantes à aplicação de fertilizante nitrogenado em doses mais elevadas como mostram a Figura 16 e 17. Além disso, os comportamentos das curvas de BioPA aos 100 DAG apresentaram desempenho semelhantes aos encontrados no QNdfsolo (Figura 15).

No final do ciclo da rebrota, a planta já utilizou suas reservas nutricionais do colmo sementes, e, por motivo, as respostas são mais expressivas quando são incrementadas as doses de N (Figura 18 B, D e F). Alguns comportamentos de pico foram observados aos 200 dias quando foi utilizado Mo (Figura 17 B, D e F). Com este comportamento das curvas, fica claro a visualização de maiores produção de biomassa em uma determinada dose de N.

As maiores contribuições aos 200 DAG das doses de N em relação à produção de biomassa da parte aérea foram observadas em doses intermediárias, na grande maioria, doses superiores a 2,94 g vaso<sup>-1</sup> e inferiores a 4 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 17 A, B, C, D e E).

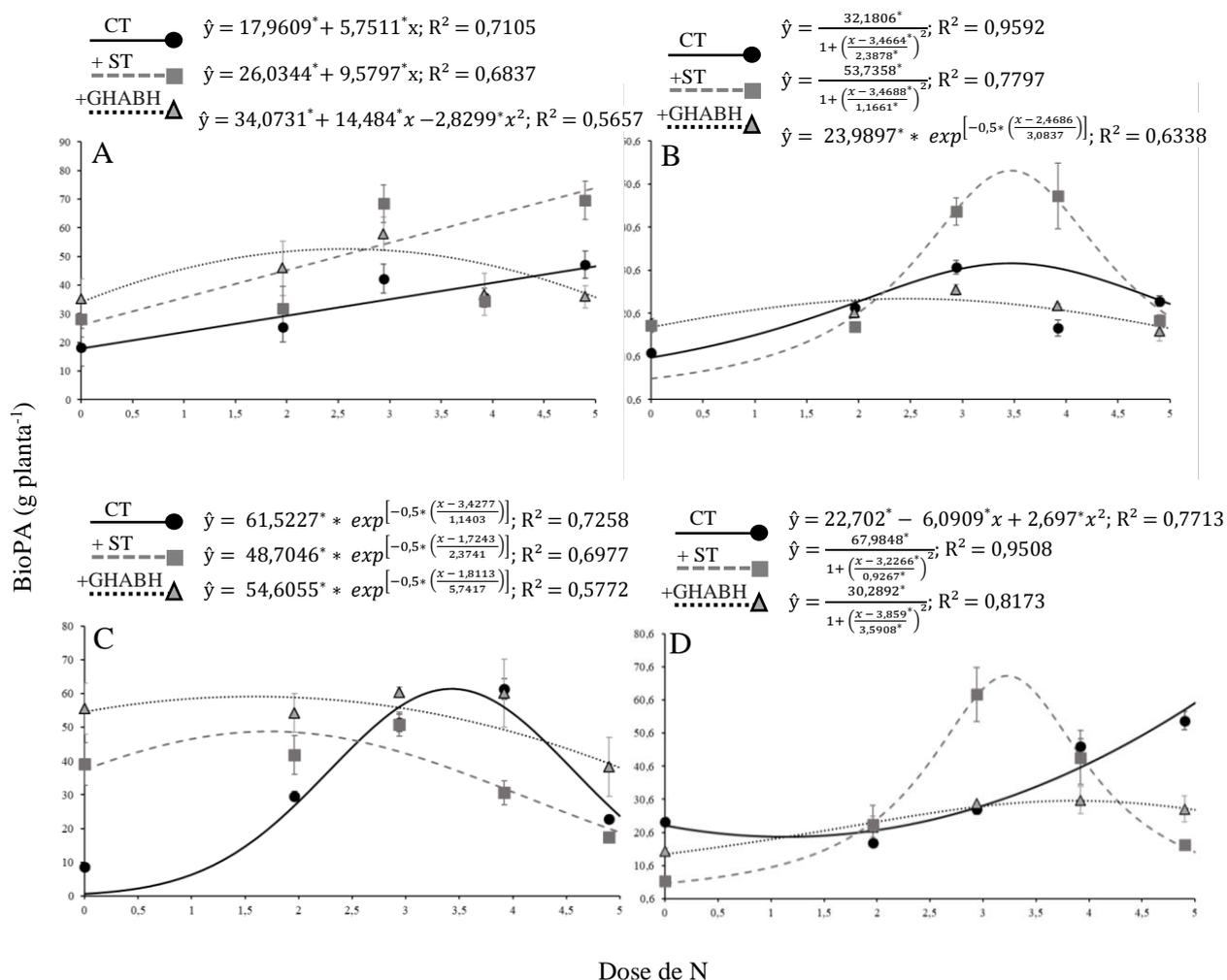


**Figura 16.** Produção de biomassa de parte aérea (BioPA) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vaso}^{-1}$ ): (A) na presença do adubo molíbdico, inoculação de ST e dose de  $1,96 \text{ g vaso}^{-1}$  de N; (B) Aplicação de  $3,9 \text{ g vaso}^{-1}$  de N. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. (Fonte: Magda Silva, 2019).



## Dose de N

**Figura 17.** Biomassa de parte aérea (BioPA) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência de inoculação; (B e D) com inoculação da bactéria ST; (E e F) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)



**Figura 18.** Biomassa de parte aérea (BioPA) na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência do adubo molibdico; (C e D) na presença do adubo molibdico. CT: Controle; N: Nitrogênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

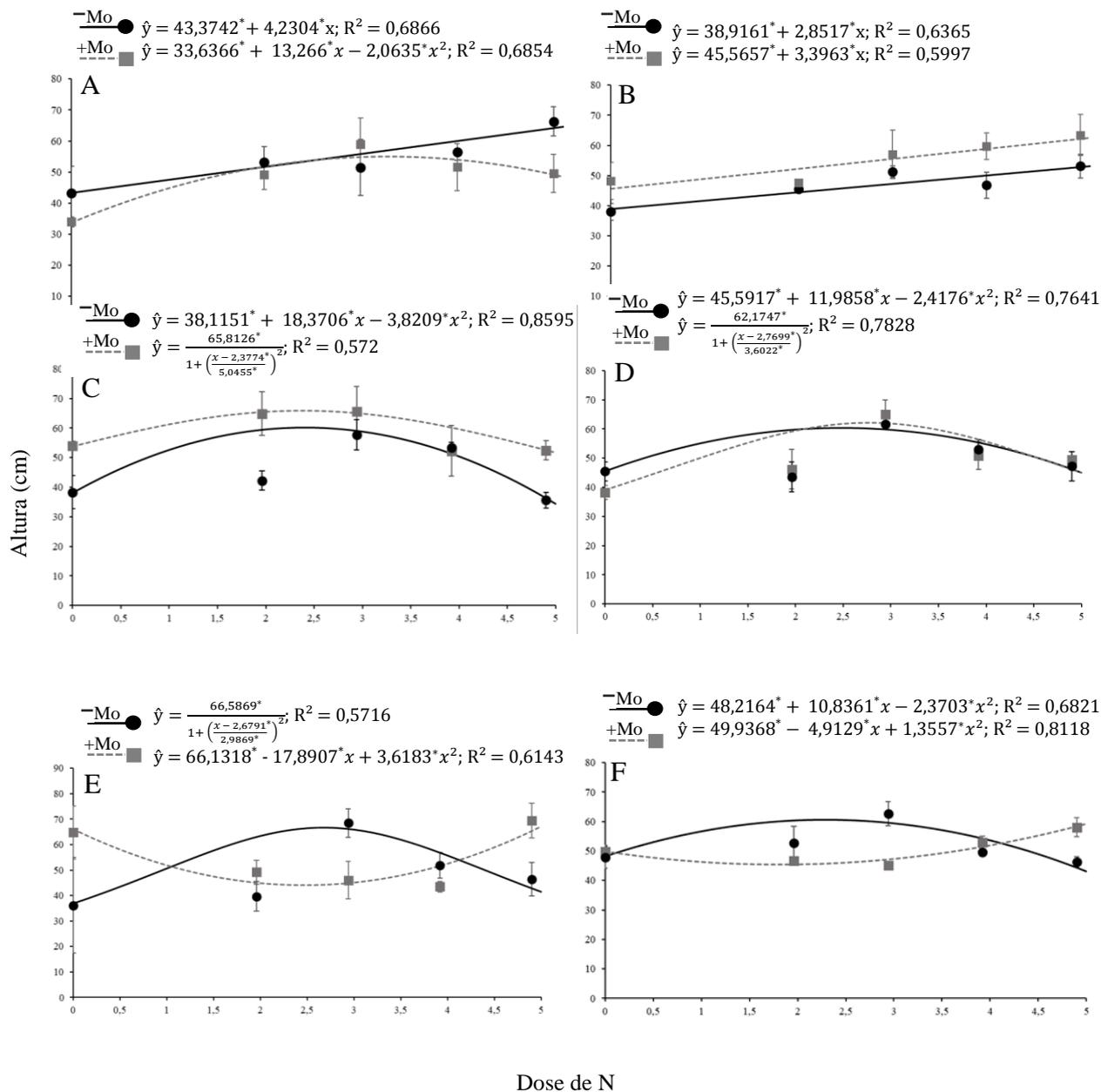
### 3.3.2 Altura

A aplicação de Mo a inoculação das bactérias influenciou a altura da planta aos 100 e 200 DAG (Figura 19 e 20). A inoculação de ST quando associada ao Mo aos 100 DAG apresentou maiores valores de altura, com pico 10% maior quando comparado ao tratamento inoculado, na dose 2,4 g vaso<sup>-1</sup>. Quando sem o N, com a associação entre Mo e ST ocasionou um incremento de 15,74 cm na variável.

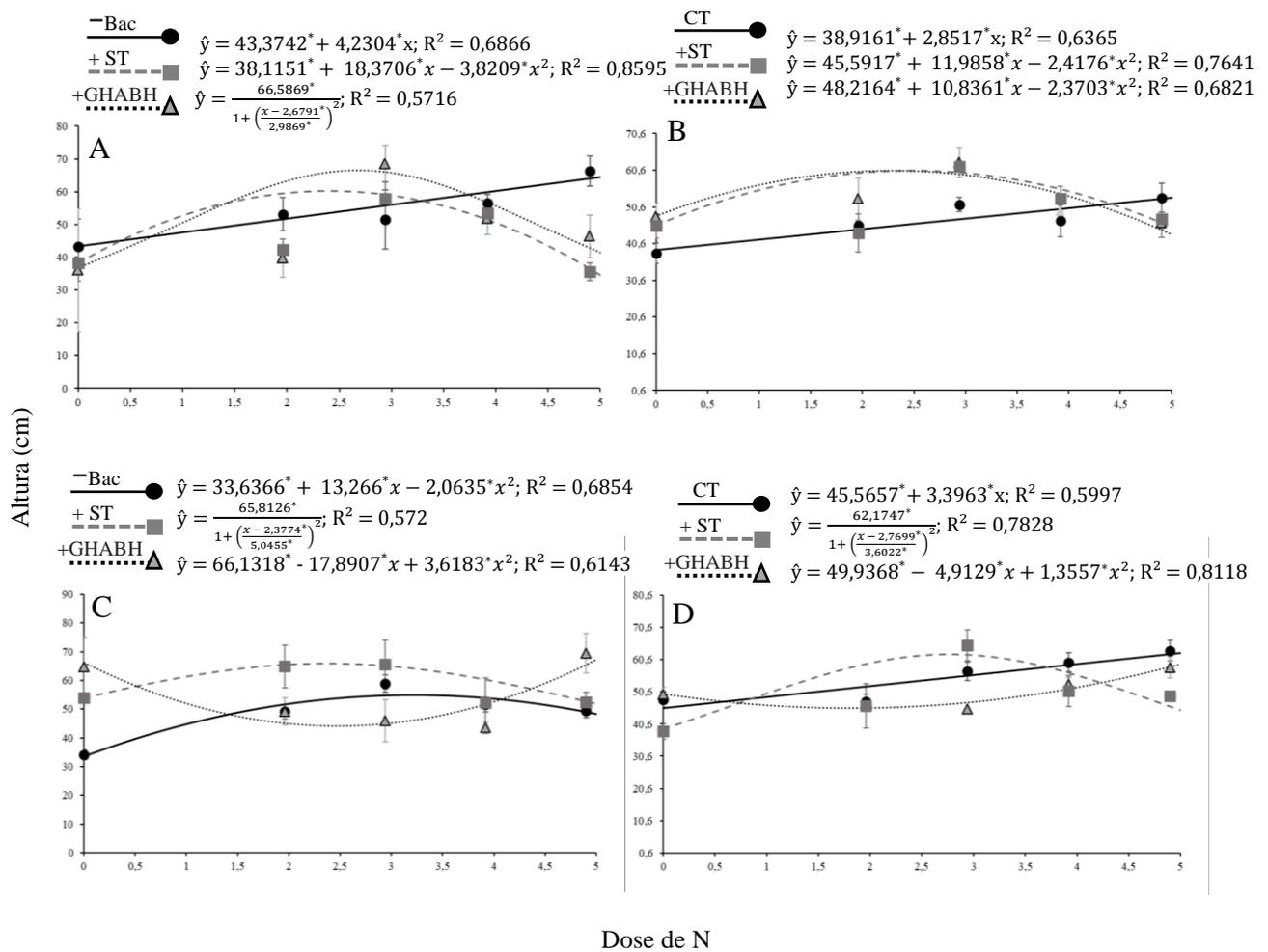
Quando inoculado com a bactéria GHABH, o parâmetro apresentou incrementos sem N e nas doses mais elevadas a partir de 4 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 19 E). Sem o N, e apenas com a aplicação do conjunto o parâmetro passou de 36,90 para 66,14 cm, o que representou incremento de 30%.

Aos 200 DAG, ao contrário da cana planta, a cana rebrota apresentou incrementos com a aplicação de Mo em 17,62% (Figura 19 B). De modo geral, apenas a aplicação de Mo aumentou o parâmetro nos aos 200 DAG (Figura 19 B). No entanto, não houve incremento com aplicação do molibdênio em conjunto com a inoculação (Figura 19 D e F).

A inoculação incrementa a altura as 100 DAG em tratamentos com a aplicação de Mo (Figura 20 C), no qual a bactéria ST apresenta os melhores resultados até a dose de 3 g vaso<sup>-1</sup>. Na cana rebrota, a inoculação causa incremento sem a presença do Mo até a dose de 3 g vaso<sup>-1</sup> para ambas bactérias e com Mo apenas para a ST. Contudo, os valores sem a aplicação de Mo são menores que com a aplicação de Mo (Figura 20 A e C).



**Figura 19.** Altura de planta na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de N-NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência de inoculação; (B e D) com inoculação da bactéria ST; (E e F) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)



**Figura 20.** Altura de planta na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG (A, C e E) e aos 200 DAG (B, D e F) em função de doses de  $N-NH_4NO_3$  (g vaso<sup>-1</sup>): (A e B) na ausência do adubo molíbdico; (C e D) na presença do adubo molíbdico. CT: Controle; N: Nitrogênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.3.3 Diâmetro

A variação do diâmetro do colmo da cana-de-açúcar aos 100 dias foi influenciada pela interação da aplicação do Mo e das estirpes bacteriana (Tabela 06).

**Tabela 06.** Diâmetro de colmo de cana-de-açúcar da variedade RB867515 cultivada sem e com Mo e bactérias promotoras de crescimento aos 100 DAG.

Mo (g vaso <sup>-1</sup> )	Diâmetro (mm)			
	Sem	Bactéria		Média
		ST	GHABH	
0	15.80 aA	11.65 bA	16.95 aA	<b>14,8</b>
0,9	10.4 aB	13.7 aA	13.1 aA	<b>12,4</b>
<b>Média</b>	<b>13,10</b>	<b>12,68</b>	<b>15,03</b>	

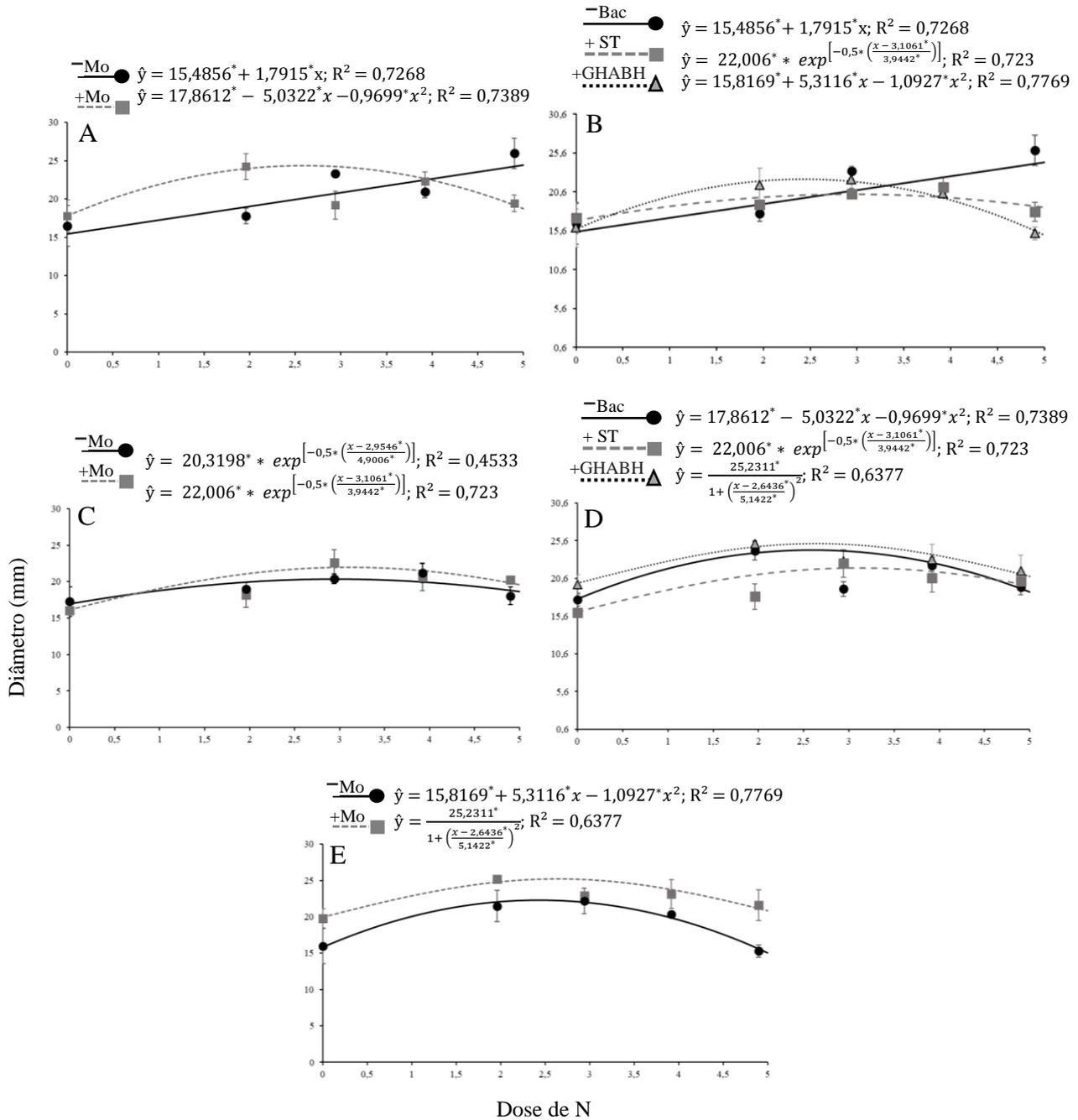
\* Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.  
Fonte: Elaborada pela autora a partir do programa R statistic, 2019.

A inoculação da GHABH influenciou no aumento do diâmetro da cana-de-açúcar aos 100 dias (Tabela 06) que corresponde a uma taxa de acréscimo de 45,49 % em relação ao tratamento com a aplicação do inoculante ST. Contudo, não houve diferença entre inocular com GHABH e o tratamento controle.

No segundo ciclo da cana-de-açúcar, aos 200 dias, por ser um novo ciclo da cultura, no qual as reservas nutricionais do colmo sementes já foram utilizadas no ciclo anterior, o efeito da adubação de Mo, do N e da inoculação com bactérias promotoras de crescimento tem um impacto maior em comparação com o ciclo anterior. Sendo assim, foi possível observar o efeito da interação tripla (Mo x Bac x N) no ganho dimensional no diâmetro da cana-de-açúcar aos 200 dias (Figura 21).

Modelos polinomiais quadráticos e exponenciais se ajustaram na grande maioria dos tratamentos. O maior efeito do Mo no diâmetro do colmo é observado na dose de 2,59 g vaso<sup>-1</sup> com 24,38 mm (Figura 21 A).

É possível observar esse mesmo comportamento quando se aplica Mo associado a estirpe bacteriana GHABH (Figura 21 E). Na dose 2,6 g vaso<sup>-1</sup> um diâmetro médio de 25,23 mm, mostrando como a associação dessa bactéria com o Mo foi benéfica, uma vez que este foi o maior pico dentre os tratamentos.



**Figura 21.** Diâmetro de colmo na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 100 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vase}^{-1}$ ): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molíbdico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molíbdico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

### 3.3.4. Biomassa de raiz

O efeito promovido na biomassa da raiz, aos 200 dias, foi obtido pela interação tripla dos fatores estudados (Bactéria, Mo e N) sendo esse demonstrado na Figura 23. Modelos lineares crescentes em relação a diferentes doses de N, com e sem a aplicação de Mo e da aplicação das diferentes estirpes bacteriana foram observados na figura A, B, C e D, nas quais a dose máxima de 4,9 g vaso<sup>-1</sup> atingiu valores superiores a 50 g planta<sup>-1</sup>(Figura 23 B, C e D) correspondendo a um incremento superior a 15% em relação à dose 0.

A aplicação de Mo contribuiu para o aumento da biomassa da raiz (Figura 23 A). O modelo que se ajustou a aplicação do Mo sem a aplicação de inoculantes foi exponencial com destaque para a dose de 2,94 g vaso<sup>-1</sup> que obteve um valor aproximadamente de 60 g planta<sup>-1</sup> de raiz, no qual o ganho alcançou a 10g que corresponde a 16,66% quando comparado ao tratamento sem aplicação de Mo.

A contribuição da produção de biomassa da raiz da cana-de-açúcar por meio da aplicação dos inoculantes foram observados, na grande maioria, quando associados a adubação molíbdica (Figura 23 D, C e E). Os modelos ajustados que representaram melhor o comportamento da biomassa em relação a diferentes doses de N, com os diferentes inoculantes e com e sem Mo, foram regressões de pico (Figura 23 B, D e E). No entanto, foi observado um comportamento linear quando foi utilizada a estirpe ST com a aplicação de Mo.

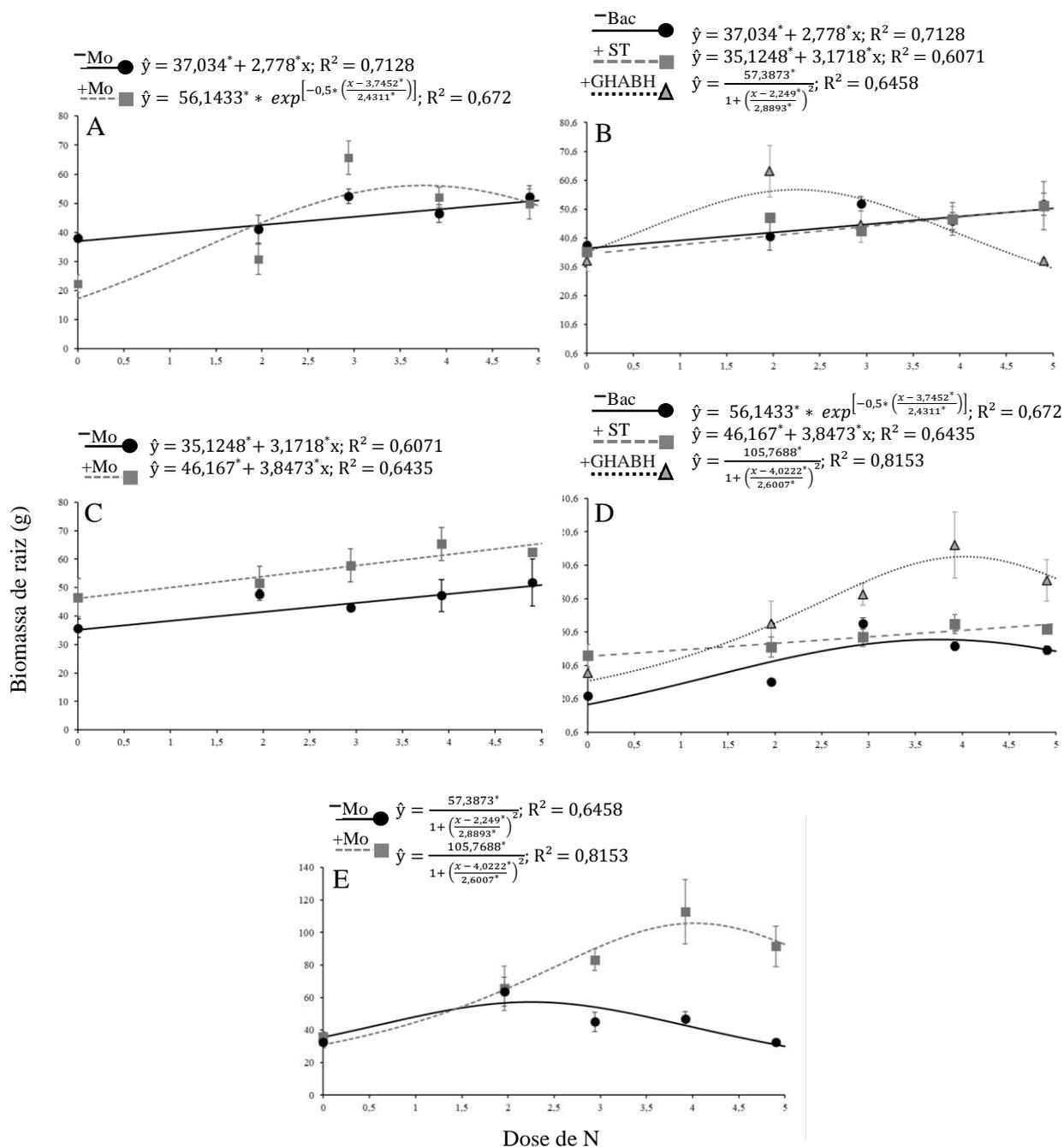
O inoculante contendo as estirpes GHABH se destacou dos demais tratamentos por apresentar uma maior produção de biomassa da raiz quando se comparado à inoculação da estirpe ST e do tratamento sem inoculante (Figura 22 B e D). Mesmo assim, ainda é possível observar ganhos expressivos na biomassa de raiz quando aplicado o Mo associado a bactéria ST quando comparados às doses mais elevadas de N (Figura 22).

Ao observar o efeito do Mo em conjunto com a estirpe GHABH, foi possível identificar a contribuição do Mo na produção da biomassa da raiz por apresentar um acréscimo de aproximadamente 40 g correspondendo a um incremento aproximado de 40% em relação ao tratamento desta estirpe sem o Mo (Figura 23 B, D e E).



**Figura 22.** Produção de biomassa de raiz na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 200 DAG em função de doses de  $N-NH_4NO_3$  ( $g\ vaso^{-1}$ ): (A) na presença do adubo molibídico, inoculação de ST e dose de  $2,94\ g\ vaso^{-1}$  de N; (B) Aplicação de  $4,9\ g\ vaso^{-1}$  de N. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. (Fonte: Magda Silva, 2019).

A dose de N que obteve maior produção da biomassa da raiz, para o tratamento com a inoculação da GHABH, variou quando foi aplicado o Mo no solo, sendo que no tratamento que não utilizou Mo (Figura 23 B) a dose de N de  $1,96\ g\ vaso^{-1}$  obteve uma maior produção que correspondeu, aproximadamente, a  $60,6\ g$ , já o tratamento que recebeu Mo a dose de N que obteve uma maior produção de biomassa correspondeu a dose de  $3,92\ g\ vaso^{-1}$  com produção média de  $100,6\ g$  (Figura 23 D e E). Portanto, se torna evidente a necessidade de aplicação de bactérias promotoras de crescimento em conjunto a adubação molibídica para promover o desenvolvimento e crescimento das raízes da cana-de-açúcar, com isto, a absorção de nutrientes, pela planta, pode ser potencializada.



**Figura 23.** Biomassa de raiz na cana-de-açúcar da variedade de RB867515 aos 200 DAG em função de doses de  $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$  ( $\text{g vase}^{-1}$ ): (A) na ausência de inoculação; (B) na ausência do adubo molibídico; (C) com inoculação da bactéria ST; (D) na presença do adubo molibídico; (E) com inoculação do coquetel de bactérias GHABH. CT: Controle; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Nitrospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.)

#### 4 DISCUSSÕES

A avaliação de micronutrientes como o molibdênio (Mo) e Ferro (Fe) que interferem diretamente em processos chaves que envolvem as contribuições das bactérias para as plantas em processos ligados as vias de assimilação do nitrato ou amônio têm sido considerados viáveis à cana-de-açúcar devido ao baixo aproveitamento do N aplicado via adubação e aos custos elevados de produção e os impactos ambientais dos fertilizantes nitrogenados.

Na presente pesquisa a aplicação de molibdênio sem a inoculação aumentou a absorção de N, os  $\text{TNH}_4^+$  e os teores de Mo, até a dose de 3 g vaso<sup>-1</sup>. Em doses mais elevadas os conteúdos foram reduzidos (Figura 05; 07; 09 A). A atividade da enzima ARN foi reduzida em relação aos tratamentos em que não houve a aplicação do micronutriente, e com isso o estoque de  $\text{NO}_3^-$  ficou elevado (Figura 04; 08 A).

Resultados apresentados por Santos et al. (2019b) mostram que aos 100 dias a aplicação de Mo incrementa em 12,12% e 30% a ARN nas folhas e raiz da cana-de-açúcar da variedade RB 867515, com isso há maior acúmulo de N, maior assimilação de  $\text{NO}_3^-$  e maior atividade da enzima ARN. O mesmo resultado é encontrado por Kavooosi et al. (2015), no qual a aplicação de 0,01  $\mu\text{M}$  de Mo em plântulas de milho quando comparado ao tratamento controle reduz a concentração de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto que a concentração de  $\text{NH}_4^+$  é muito maior o que eleva a atividade da ARN na planta. Contudo, esta tendência não foi observada nesta pesquisa.

Nossos resultados mostram que apesar do micronutriente Mo apresentar função ligada à troca de elétrons na enzima ARN e auxiliar na maior assimilação do N- $\text{NO}_3^-$  na planta, mesmo com a aplicação de Mo, a planta ainda pode apresentar a atividade da enzima ARN baixa e por este motivo, acumular o  $\text{NO}_3^-$ . Kavooosi et al. (2015) sugerem que a relação Mo,  $\text{NO}_3^-$  e ARN pode ser influenciada não apenas pelo suprimento de molibdênio bem equilibrado, mas também pelos níveis do micronutriente, pela absorção de nitrato, pela absorção de amônio, pela redução de nitrato e pela assimilação geral de nitrogênio na planta.

Quando havia inoculação das bactérias ST, a aplicação de Mo elevou a ARN, a absorção de N e os TMo, assim como reduziu os  $\text{TNO}_3^-$  nos tecidos da cana-de-açúcar (Figuras 04; 05; 08; 09 B). A aplicação de Mo não influenciou o N total, contudo, a inoculação de ST proporcionou melhorias nos teores de N em 16,65% (Figura 06). Com a associação das bactérias GHABH e a aplicação do micronutriente, os  $\text{TNH}_4^+$  foram reduzidos enquanto que os  $\text{TNO}_3^-$  foram elevados, especialmente em doses inferiores a 3 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 07; 08 E). Houve incremento do N absorvido em 21,02%, mas não houve contribuição no N total da cultura (Figura 05 E e 06).

Silveira et al. (2016) e Santos et al. (2017) relatam que a atividade da ARN e da glutamina sintetase é influenciada pela inoculação de BPCP em condições de baixo suprimento de N em razão das BPCP diazotróficas fornecerem diretamente o  $\text{NH}_4^+$  ou promover maior desenvolvimento do sistema radicular por ação hormonal direta o que permite a melhoria na captação de N de outras fontes, como do fertilizante.

Neste segmento, diazotrófos podem alterar os  $\text{TNO}_3^-$  e  $\text{TNH}_4^+$  em plantas e, conseqüentemente, a indução de enzimas relacionadas ao metabolismo de N (SANTOS et al., 2017). Neste sentido, as BPCP podem influenciar e integrar vários processos metabólicos que podem regular genes da planta que são relacionados ao metabolismo de N e que em geral, podem ser pertinentes a assimilação de amônio ou nitrato (CARVALHO et al., 2014).

Como mostram Camilios-Neto et al. (2014) em plantas de trigo que a inoculação de *Azospirillum brasilense* aumentou a expressão de genes relacionados à absorção de nutrientes e a assimilação de N. Na mesma pesquisa, também foram elevadas a expressão de genes ligados a replicação de DNA e regulação da divisão celular, o que suporta a hipótese que o uso de BPCP podem melhorar não só a aquisição de nutrientes como o N, mas também aumentar a produtividade das plantas.

Além do auxílio no mecanismo de fonte de N via  $\text{NO}_3^-$  há um incontestável papel dos BPCP e do micronutriente como fonte de aporte de  $\text{NH}_4^+$  em plantas não leguminosas. Aqui, para as bactérias GHABH houve diferença no acúmulo de N em conjunto com o Mo até a doses próximas de 3 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 11 E) devido à redução do  $^{15}\text{N}$  na folha +1 em 17,38%, o que resultou em um ganho de 12% na %Nddfix e de 72,1 mg planta<sup>-1</sup> da QNddfix (Figuras 10; 12; 13 E).

A aplicação do Mo associado as BPCP na cana-de-açúcar estimula a FBN, principalmente na ausência de adubação nitrogenada (SANTOS et al., 2019c), uma vez que a função específica do micronutriente é de transporte de elétrons no momento das reações bioquímicas da enzima nitrogenase, responsável pela conversão de N atmosférico em amônia ( $\text{NH}_3$ ) no processo de FBN (MENDEL; LEIMKUHNER, 2015). Contudo, a eficiência dessa contribuição pode variar de acordo com a estirpe selecionada e a variedade escolhida (BREDA et al., 2018).

É o que podemos observar quando vemos os resultados obtidos com a aplicação do Mo associado ao inoculante ST no qual contribuições próximas a zero são encontradas até a dose 2,7 g vaso<sup>-1</sup>. Em doses mais elevadas as contribuições são muito baixas sendo em média 4,11% para a abundância de átomos de  $^{15}\text{N}$  e 4,04 % para a %Nddfix o que representa apenas 113,97 mg planta<sup>-1</sup> no QNddfix (Figura 10; 12 e 13 B). Ainda, com a entrada do Mo houve queda média de 41,3% no acúmulo de N a partir da dose 2,3 g vaso<sup>-1</sup> (Figura 11 C).

Para este inoculante, não houve resposta à FBN com a aplicação do Mo. Por isso, podemos dizer que a aplicação do Mo associado ao inoculante ST foi mais atuante no processo de assimilação de N via  $\text{NO}_3^-$ , como mostram as Figuras 04; 07 e 08 B.

Apesar das bactérias GHABH terem apresentado uma boa contribuição das FBN, isso não foi suficiente para atender a demanda da planta, uma vez que houve maior contribuição neste tratamento do fertilizante, como mostra a Figura 15 E. Hiyama et al. (2013) ao avaliar plântulas de cana-de-açúcar observaram que, apesar de haver a contribuição de 20,45% do  $\text{N}_{\text{dffix}}$  e 15,90% do  $\text{N}_{\text{dfsolo}}$ , o fertilizante era o maior responsável pela contribuição no conteúdo total de N, apresentando contribuição de 63,6%. Utilizando a bactéria ST em associação ao adubo molíbdico na variedade RB867515, Silva (2016) encontrou incrementos de 47,39% na  $\% \text{N}_{\text{dffix}}$  o que representou 26,14 mg planta<sup>-1</sup>. Contudo, essa contribuição não foi suficiente para atender a demanda da planta estimada em 363,24 mg planta<sup>-1</sup>. Kuan et al. (2016) em experimento de casa de vegetação mostram que plantas de milho inoculadas com *Bacillus pumilus* associado a baixas aplicações de N fertilizante apresentaram maior capacidade de fixação de  $\text{N}_2$  em torno de 30,5% da necessidade total de N da parte aérea do milho.

Em nossos resultados ficou claro que o processo de FBN é rigorosamente regulado pela disponibilidade de N, uma vez que, a  $\% \text{N}_{\text{dffix}}$  e a  $\text{QN}_{\text{dffix}}$  foram reduzidos drasticamente com o incremento das doses de N independentemente do tratamento. Dessa forma, praticamente todo o N que incrementou a QNT teve origem do fertilizante, em virtude do alto  $\text{N}_{\text{dfsolo}}$  (Figura 14) e da  $\text{QN}_{\text{dfsolo}}$  (Figura 15) até a dose de 3 g vaso<sup>-1</sup>. Portanto, é incontestável a contribuição do fertilizante nitrogenado na QNT da planta, independentemente da inoculação.

Esse comportamento ocorre porque na presença de uma fonte externa de N, a atividade da enzima nitrogenase é reduzida, o que diminui a contribuição da FBN para a planta, independentemente de qual seja a fonte fertilizante utilizada (SUMAN et al., 2008). A inibição da atividade desta enzima ocorre devido ao alto consumo de energia que o processo de FBN apresenta, no qual a redução de 1 mol de  $\text{N}_2$  requer 16 ATP podendo chegar a 40 ATP por mol do nutriente, a depender dos processos de proteção da nitrogenase (BATISTA; DIXON, 2019). Com isso, é preferível a obtenção do N da fonte fertilizantes, que apresenta menor demanda de energia para obtenção do nutriente.

A inoculação associada ao fornecimento de N favorece o crescimento e desenvolvimento da planta no início do estabelecimento da cultura da cana-de-açúcar (GÍRIO et al., 2015). Contudo, com o desenvolvimento fenológico e estágios mais avançados da cultura, a contribuição da FBN é reduzida, o que eleva os valores de  $^{15}\text{N}$  nas folhas de cana-de-açúcar (GAVA et al., 2018). Assim, a principal fonte de N passa a ser proveniente de fertilizantes sintéticos e da mineralização de N da matéria orgânica do solo.

Em geral, os trabalhos com inoculação de bactérias diazotróficas não encontram alta contribuição da FBN e no N total da planta, principalmente, quando realizados em condições de campo (SCHULTZ et al., 2014; SCHULTZ et al., 2017).

Como a pesquisa de Schultz et al. (2012) que avaliando a eficiência da inoculação do conjunto de bactérias GHABH e da adubação nitrogenada observou que na variedade RB867515, não houve diferença significativa para o acúmulo de N total na parte aérea das plantas promovidos entre a inoculação, e a adubação nitrogenada.

Contudo, em geral, todas essas pesquisas mostram incrementos significativos na biomassa e produtividade da cana-de-açúcar.

Como Pereira et al. (2013a) que avaliaram seis variedades de cana-de-açúcar em campo experimental e observaram que a variedade mais responsiva à inoculação foi a RB867515 que apresentou incremento semelhante à adubação nitrogenada na variável o número de colmos e para o acúmulo de matéria seca. Porém, esta resposta não teve relação direta com o acúmulo de nitrogênio nessa variedade.

No nosso trabalho, a aplicação do Mo resultou em maiores incrementos na BioR aos 200 DAG e na Biopa aos 100 e 200 DAG (Figura 17 A e B; 22 A), mas quando inoculado com a ST associado ao Mo, houve incremento desses parâmetros e da altura aos 100 DAG até doses próximas à 2,5 g vaso<sup>-1</sup> aos 100 DAG (Figura 17 C e D; 18 C; 22 C). Além desses resultados, também foi observado incrementos com a inoculação da GHABH conjunta a aplicação do Mo para a Biopa aos 100 e 200 DAG e o BioR (Figura 17 E e F; 22 E). Aos 200 DAG houve incremento com a aplicação de Mo no diâmetro (Figura 21 E).

Na cultura do trigo, Silveira et al. (2015) concluem que a inoculação de BPCP auxilia o metabolismo do N e, por este motivo, o crescimento das plantas são impactados positivamente pela inoculação. Além disso, o impulso ocasionado pela associação de inoculantes, Mo e baixas doses de N causa aumento da matéria seca das raízes primárias e está relacionada a uma melhor germinação e vigor das mudas, uma vez que as raízes dos caules primários são importantes para a água e nutrientes absorção e síntese hormonal (JADOSKI; TOPPA; RODRIGUES, 2012). Dessa forma, as plantas conseguem desenvolver melhor suas raízes e ter acesso a maior quantidade de nutrientes.

Na pesquisa de Oliver e Silva (2018) quando o inoculante GHABH foi combinado a doses de 60 e 90 kg ha<sup>-1</sup> de N a associação promoveu maior incremento no acúmulo de matéria seca, e maior eficiência e aproveitamento do fertilizante nitrogenado. Por outro lado, no mesmo estudo, os resultados encontrados com uma dose muito elevada de N, como a de 120 kg ha<sup>-1</sup> de N promoveu redução de todos os parâmetros de crescimento da planta mesmo resultado encontrado em nossa pesquisa.

Neste sentido, a aplicação conjunta de doses baixas de N, inoculação com BPCP e aplicação do micronutriente Mo resulta no melhor desenvolvimento da planta, aproveitamento do N disponível mais eficiente com redução da dose de aplicação de fertilizantes nitrogenados. Ainda, reduz os custos de produção, uma vez que os custos com fertilizantes nitrogenados são elevados, enquanto que o custo de aplicação do inoculante e do Mo é baixo (EMBRAPA, 2020; CONAB, 2019b; OLIVEIRA et al., 2015).

Taulé et al. (2019) avaliando o efeito da inoculação promoção de crescimento da cana-de-açúcar em condições não estéreis mostra que as estirpes utilizadas foram capazes de promover o crescimento de plantas de cana-de-açúcar, mas que a FBN era apenas um dos mecanismos que estavam envolvidos. O efeito das BPCP tem sido associado a vários mecanismos, principalmente a produção de substâncias reguladoras do crescimento das plantas (CASSÁN; VANDERLEYDEN; SPAEPEN, 2014).

No que se refere ao Mo, este ainda é apontado como um importante contribuidor do crescimento e desenvolvimento vegetal, uma vez que sua introdução no sistema planta associado a inoculação pode influenciar funções envolvidas em processos que atuam no crescimento e desenvolvimento da planta, no catabolismo de purina, no metabolismo do enxofre ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), na catálise reductiva de compostos hidroxilados e na síntese de hormônios do ABA e do AIA (TEJADA-JIMENEZ et al., 2013; TEJADA-JIMENEZ et al., 2017; TEJADA-JIMENEZ et al., 2018).

Quando há uma interação planta-microbionte, as bactérias que produzem o AIA o utilizam como molécula de sinalização recíproca (DUCA et al., 2014), mas esse hormônio produzido adicionalmente por esses microrganismos pode estimular na planta a formação de pêlos da raiz enquanto aumenta o número e o comprimento das raízes laterais e primárias numa faixa de concentração ideal (MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2008; MALHOTRA; SRIVASTAVA, 2009).

Em avaliação da contribuição da adubação molíbdica em interação com a bactéria *Stenotrophomonas* sp. e adubação nitrogenada na variedade RB867515, Silva (2016) observou que apesar do incremento da biomassa seca da parte aérea ter sido significativo passando de 91,86 para 150,3 g planta<sup>-1</sup> aos 100 dias, a contribuição do N via FBN e redutase não foram significativos. Portanto, os incrementos obtidos e influenciados podem ter sido em função da promoção de crescimento, visto algumas estirpes possuem a capacidade de produzir ácido-3-indol acético (LIMA et al., 2018).

Portanto, o Mo atuou em conjunto a adubação nitrogenada e as bactérias diazotróficas na melhoria da eficiência de absorção dos fertilizantes e na promoção de crescimento da planta estimulando o desenvolvimento da parte aérea, raiz e altura da planta.

Por este motivo, diretrizes para implantação de novos ensaios que realizem avaliações detalhadas dos fatores que influenciam a promoção de crescimento em plantas devem ser adotadas e aprofundadas, possibilitando assim a recomendação desses inoculantes em conjunto ao Mo para o campo.

## 5 CONCLUSÕES

- A utilização do adubo molíbdico associada à inoculação da ST promove incremento na redutase do nitrato e redução dos teores de nitrato o que potencializa a assimilação de N em plantas de cana-de-açúcar;
- O inoculante ST associado ao Mo auxilia no incremento do N foliar e nos teores de amônio com redução nos teores de nitrato proporcionando melhor aproveitamento do fertilizante aplicado;
- A inoculação com as bactérias ST elevam o N total da cana-de-açúcar;
- A utilização do adubo molíbdico associada ao conjunto de bactérias GHABH promove incremento na FBN;
- O incremento do N via fonte de FBN não é suficiente para suprir a necessidade e demanda da cultura da cana-de-açúcar;
- A adubação molíbdica em conjunto com as bactérias ST proporcionam melhor crescimento e desenvolvimento da biomassa de parte aérea, biomassa de raiz e altura na cultura da cana-de-açúcar;
- O conjunto de bactérias GHABH associado ao Mo proporcionam melhor crescimento e desenvolvimento da biomassa de parte aérea e biomassa de raiz da cana-de-açúcar;
- Em geral, para todos os parâmetros avaliados, a combinação da inoculação e aplicação do adubo molíbdico apresentaram melhores resultados em doses intermediárias, com a dose 3 g vaso<sup>-1</sup> sendo mais expressiva;
- As bactérias ST associada ao Mo apresentam potencial para uso como pacote tecnológico quando associados a doses de N intermediárias, uma vez que estimulam os parâmetros de crescimento semelhante a doses elevadas de N e promovem melhorias no aproveitamento do fertilizante aplicado.

## REFERÊNCIAS

APAC - Agência Pernambucana de Águas e Clima. **Agrometeorologia**. Disponível em: <<https://www.apac.pe.gov.br/>>. Acesso em: 22 nov. 2019b.

APAC - Agência Pernambucana de Águas e Clima. **Dados temperatura e umidade**. Destinatário: Ericka Vanessa Silva de Melo, Gestora de Articulação e comunicação, <[ericka.melo@apac.pe.gov.br](mailto:ericka.melo@apac.pe.gov.br)>. Mensagem recebida por Magda A. da Silva, <[mf.silva@agronoma.eng.br](mailto:mf.silva@agronoma.eng.br)> em 03 dez. 2019a. Mensagem eletrônica.

APHA, 2012. **Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater**, 22<sup>nd</sup> Ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC. 724 p.

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

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

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2004. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>>.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 365, 1984.

BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. **Localization of *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* sp. in rice root system**. In: International Symposium on Microbiol Ecology, 7, Santos, SP, Brasil, 133 p., 1995.

BARTH, G.; OTTO, R.; ALMEIDA, R. F.; CARDOSO, E. J. B. N.; CANTARELLA, H.; VITTI, G. C. Conversion of ammonium to nitrate and abundance of ammonium-oxidizing-microorganism in tropical soils with nitrification inhibitor. **Scientia Agricola**, v. 77, n. 4, p. 2–6, 2020. <DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-992X-2018-0370>>.

BATISTA, M. B.; DIXON, R. Manipulating nitrogen regulation in diazotrophic bacteria for agronomic benefit. **Biochemical Society Transactions**, v. 47, n. 2, p. 603–614, 2019. <doi:10.1590/0001-3765201920180990>.

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the <sup>15</sup>N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N<sub>2</sub> fixation to sugar cane and other grasses. **Functional Plant Biology**, v. 28, n. 9, p. 889–895, 2001. <<https://doi.org/10.1071/pp01058>>.

BOUYOUCOS, G. J. Estimation of the colloidal material in soils. **Science**, v. 64, p. 362, 1926. <doi: 10.1126 / science.64.1658.362>.

BREDA, F. A. DA F.; DA SILVA, T. F. R.; DOS SANTOS, S. G.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 4, p. 547–558, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s00203-018-1594-z>>.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C.; PACHECO, F.; ALJANABI, S. M. M.; MONTEIRO, R. A.; CRUZ, L. M., BAURA; V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 113–125, 2011. <<https://doi.org/10.1007/s11104-011-1044-z>>.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., GILARD, F., BRULÉ, L., QUILLERÉ, I., GOURION, B., RATET, P., SOUZA, E. M. DE.; LEA, P. J.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–19, 2017. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174576>>.

CAMILIOS-NETO, D., BONATO, P., WASSEM, R., TADRA-SFEIR, M. Z., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C., VALDAMERI, G.; LUCÉLIA, D.; HELISSON, F.; VINICIUS A. W.; LEDA S. C.; FÁBIO O. P.; SOUZA, E. M. Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, p. 1–13, 2014. <<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-378>>.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E., ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 2013. <<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. **Plant and Soil**, v. 417, n. 1–2, p. 403–413, 2017. <[doi: 10.1007 / s11104-017-3267-0](https://doi.org/10.1007/s11104-017-3267-0)>.

CARVALHO, T. L., PIRES, E., SARAIVA, R., VARGAS, L., BOMFIM, A. C. J., BALLESTEROS, H.; BALDANI, J. I.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A. S. Nitrogen fixation in grasses - *Gluconacetobacter* activates genes in sugarcane. **BMC Proceedings**, v. 8, n. S4, p. 1–3, 2014. <<https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-S4-O20>>.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440–459, 2014. <<https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>>.

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 345, n. 1, p. 155–169, 2011. <<https://doi.org/10.1007/s11104-011-0768-0>>.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen- fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988. <[doi:10.1007/BF02370096](https://doi.org/10.1007/BF02370096)>.

CHAMIZO-AMPUDIA, A.; SANZ-LUQUE, E.; LLAMAS, A.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 2, p. 163–174, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.001>>.

CHAVES, V. A.; DOS SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1595–1602, 2015. <<https://doi.org/10.1590/01000683rbc20151144>>.

CHAWLA, N.; PHOUR, M.; SUNEJA, S.; SANGWAAN, S.; GOYAL, S. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: An overview. **Research in Environment and Life Sciences**, Nova York, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2014.

COHEN, A.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in Arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p. 97–103, 2008. <[doi: 10.1007/s10725-007-9232-9](https://doi.org/10.1007/s10725-007-9232-9)>.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v.7, n. 11, Brasília: CONAB, 2019b. 33 p.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p. 1464–1473, 1976. <[doi: 10.1139/m76-217](https://doi.org/10.1139/m76-217)>.

DÖBEREINER, J.; PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F. L.; URQUIAGA, S. Bactérias diazotróficas podem ser endofíticas ou fitopatogênicas? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 62, p. 319, 1990.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014. <<https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>>.

EMBRAPA - Embrapa Solos. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Brasília, DF: Embrapa Solos, 2009. 627p.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2020. **Fixação Biológica de Nitrogênio**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2 ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2017. 212p.

FAN, B.; CHEN, X. H.; BUDIHARJO, A.; BLEISS, W.; VATER, J.; BORRISS, R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 4, p. 303-311, 2011. <[doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.12.022](https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.022)>.

FORLI, F.; OTTO, R.; VITTI, G. C.; VALE, D. W. DO; MIYAKE, R. T. M. Micronutrients application on cultivation of sugarcane billets. **Academic Journals**, v. 12, n. 10, p. 790 – 794, 2018. <<https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11382>>.

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. <[doi: 10.5897/AJAR2016.11382](https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11382)>.

GAVA, G. J. DE. C.; SCARPARE, F. V.; CANTARELLA, H.; KÖLLN, O. T.; RUIZ-CORRÊA, S. T.; ARLANCH, A. B.; TRIVELIN, P. C. O. Nitrogen source contribution in sugarcane-inoculated plants with diazotrophic bacteria under urea-N fertigation management. **Sugar Tech**, v. 21, n. 3, p. 462–470, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s12355-018-0614-2>>.

GÍRIO, L. A. DA S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Plant growth-promoting bacteria and nitrogen fertilization effect on the initial growth of sugarcane from pre-sprouted seedlings. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 33–43, 2015. <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100004>>.

HILLE, R.; NISHINO, T.; BITTNER, F. Molybdenum enzymes in higher organisms. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 9–10, p. 1179–1205, 2011. <[doi: 10.1016 / j.ccr.2010.11.034](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.034)>.

HIYAMA, T., MOMOSE, A., NISHIMURA, K., ISHIZAKI, N., ISHIKAWA, S., YAMAMOTO, M.; HUNG, N.; CHAMAIPORN, A.; RUAMRUNGSRI, S.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; OHYAMA, T. Estimation of contribution of nitrogen fixation in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants with <sup>15</sup>N dilution method in relation to nitrogen supply period. **Relatório de Pesquisa da Faculdade de Agricultura da Universidade de Niigata**, Niigata, v. 66, n. 1, p. 11–19, 2013.

ILYAS, N.; BANO, A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 4, p. 393–406, 2010. <[doi: 10.1007 / s00374-009-0438-z](https://doi.org/10.1007/s00374-009-0438-z)>.

INTORNE, A. C.; OLIVEIRA, M. V. V. DE.; LIMA, M. L.; DA SILVA, J. F.; OLIVARES, F. L.; SOUZA FILHO, G. A. DE. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 5, p. 477–483, 2009. <<https://doi.org/10.1007/s00203-009-0472-0>>.

JADOSKI, C. J.; TOPPA, E. V. B.; RODRIGUES, J. D. Desenvolvimento Mofofisiológico de Raízes e Brotos da Cana-de-Açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 2, p. 22–32, 2012. <<https://doi.org/10.18188/1983-1471/sap.v11n2p22-32>>.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 43, p. 1274–1279, 1971. <[doi: 10.1016/s0006-291x\(71\)80010-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(71)80010-4)>.

KAVOOSI, G.; BALOTF, S.; ESHGHI, H.; HASANI, H. Analysis of nitrate reductase mRNA expression and nitrate reductase activity in response to nitrogen supply. **Molecular biology research communications**, v. 3, n. 2, p. 75–84, 2014. <<https://doi.org/10.22099/mbr.2014.1960>>.

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.

KOVÁCS, B.; PUSKÁS-PRESZNER, A.; HUZSVAI, L.; LÉVAI, L.; BÓDI, É. Effect of molybdenum treatment on molybdenum concentration and nitrate reduction in maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 38–44, 2015. <[doi: 10.1016 / j.plaphy.2015.07.013](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.07.013)>.

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; RAHIM, K. A.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>>.

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. <<https://doi.org/10.2134/agronj1941.00021962003300110005x>>.

LERY, L. M. S., COELHO, A., VON KRUGER, W. M. A., GONÇALVES, M. S. M., SANTOS, M. F., VALENTE, R. H.; SANTOS, E. O.; ROCHA, S. L.G.; PERALES, J.;DOMONT, G. B.; TEIXEIRA, KATIA R.S.; BISCH, P. M. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics**, v. 8, n. 8, p. 1631–1644, 2008. <<https://doi.org/10.1002/pmic.200700912>>.

LERY, L. M. S., COELHO, A., VON KRUGER, W. M. A., GONÇALVES, M. S. M., SANTOS, M. F., VALENTE, R. H.; SANTOS, E. O.; ROCHA, S. L. G.; PERALES, J.; DOMONT, G. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BISCH, P. M. Tolerance of potentially diazotrophic bacteria to adverse environmental conditions and plant growth-promotion in sugarcane. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 11, p. 1534–1548, 2018. <<https://doi.org/10.1002/pmic.200700912>>.

LERY, L. M. S.; HEMERLY, A. S.; NOGUEIRA, E. M.; VON KRÜGER; W. M. A.; BISCH, P. M. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 562–576, 2011. <<https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0178>>.

LIMA, D. R. M. DE, SANTOS, I. B. DOS, OLIVEIRA, J. T. C., BARBOSA, J. G., DINIZ, W. P. DA S., FARIAS, A. R. B. DE.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Tolerance of potentially diazotrophic bacteria to adverse environmental conditions and plant growth-promotion in sugarcane. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 11, p. 1534–1548, 2018. <<https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1443212>>.

LI-PING, W.; YANG-RUI, L.; LI-TAO, Y. Effects of molybdenum on nitrogen metabolism of sugarcane. **Sugar Tech**, v. 9, n. 1, p. 36–42, 2007. <<https://doi.org/10.1007/BF02956911>>.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 606–618, 2011. <[doi: 10.1007 / s00248-010-9780-9](https://doi.org/10.1007/s00248-010-9780-9)>.

MA, J., BEI, Q., WANG, X., LAN, P., LIU, G., LIN, X.;LIU, Q.; LIN, Z.; LIU, B.; ZHANG, Y.; JIN, H.; HU, T.; ZHU, J.; XIE, Z. Impacts of Mo application on biological nitrogen fixation and diazotrophic communities in a flooded rice-soil system. **Science of the Total Environment**, v. 649, p. 686–694, 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.318>>.

MAGALHÃES, F. M.M. et al. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417–430, 1983.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, Antonie van Leeuwenhoek, v. 93, n. 4, p. 425–433, 2008. <doi: 10.1007 / s10482-007-9207-x>.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 73–80, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.05.006>.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Estatísticas do comércio exterior**. 2020. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 15 jan. 2020.

MEENAKSHISUNDARAM, M.; SANTHAGURU, K. Isolation and nitrogen fixing efficiency of a novel endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* associated with *Saccharum officinarum* from southern districts of Tamil Nadu. **International Journal of Biological & Medical Research**, Índia, v. 1, n. 4, p. 298-300, 2010.

MENDEL, R. R.; LEIMKÜHLER, S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 337–347, 2015. <doi: 10.1007 / s00775-014-1173-y>.

MOKHELE, B.; ZHAN, X.; YANG, G.; ZHANG, X. Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 92, n. 3, p. 399–405, 2012. <https://doi.org/10.4141/CJPS2011-135>.

MONTEIRO, R. A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., MARIN, A. M., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C., SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C.S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 175–196, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, n. 4, p. 723–737, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x>.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E.; de L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 59–61, 2003. <doi: 10.1590/S1517-83822003000500020>.

OLIVEIRA, C. O. E; LAZARINI, E.; TARSITANO, M. A. A.; PINTO, C. C.; SÁ, M. E. DE. Custo e lucratividade da produção de sementes de soja enriquecidas com molibdênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 1, p. 82–88, 2015. <https://doi.org/10.1590/1983-40632015v4527961>.

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

OLIVEIRA, R. I. de.; 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**, Queensland, v. 10, n. 1, p. 69–75, 2016.

OLIVER, R.; DE ALMEIDA SILVA, M. Interaction between diazotrophic bacteria and N-fertilizer doses on sugarcane crop. **Journal of Plant Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 722–736, 2018. <<https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425436>>.

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. <<https://doi.org/10.1007/s00374-013-0787-5>>.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. DE S.; DOS SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 2, p. 363–370, 2013. <<https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000200020>>.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.Rproject.org/>>.

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 nov. 2019.

RODRIGUES NETO J.; MALAVOLTA JÚNIOR V.A.; VICTOR O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. **Suma Phytopathologica**, Botucatu, v.12, p.16, 1986.

RSTUDIO TEAM. **RStudio: Integrated Development for R**. RStudio, Inc., Boston, 2015. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>.

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. <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000500008>>.

SANTOS, R. L. DOS, FREIRE, F. J., DE OLIVEIRA, E. C. A., FREIRE, M. B. G. D. S., WEST, J. B., BARBOSA, J. DE A.; MOURA, M. J. A. DE.; BEZERRA, P. DA C. Nitrate reductase activity and nitrogen and biomass accumulation in sugarcane under molybdenum and nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 43, p. 1–19, 2019b. <<https://doi.org/10.1590/18069657rbc20180171>>.

SANTOS, R. L. DOS, FREIRE, F. J., OLIVEIRA, E. C. A. DE, BARBOSA, J. DE A., MOURA, M. J. A. DE, LOPES, N. R. DA C.; COSTA, L. G. DE A. F.; GUEDES, V. H. DE F.; OLIVEIRA, D. M. DE A. SANTOS, M. B. DA C. Sampling of Sugarcane Leaves in Field Experiments to Determine the Activity of Nitrate Reductase. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 49, n. 1, p. 76–87, 2018. <<https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1421648>>.

SANTOS, R. L. DOS.; FREIRE, F. J.; DE OLIVEIRA, E. C. A.; TRIVELIN, P. C. O.; SANTOS FREIRE, M. B. G. DOS.; COSTA BEZERRA, P. DA.; OLIVEIRA, R. I. DE.; COSTA SANTOS, M. B. DA. Changes in Biological Nitrogen Fixation and Natural-Abundance N Isotopes of Sugarcane Under Molybdenum Fertilization. **Sugar Tech**, v. 21, n. 6, p. 925–935, 2019c. <<https://doi.org/10.1007/s12355-019-00717-w>>.

SANTOS, S. G. DOS.; DA SILVA RIBEIRO; F., DA FONSECA; C. S., PEREIRA, W.; SANTOS, L. A.; REIS, V. M. Development and nitrate reductase activity of sugarcane inoculated with five diazotrophic strains. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 6, p. 863–873, 2017. <<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1357-2>>.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDAC, M. DEL C.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016. <[doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008)>.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: Their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 1, p. 130–140, 2008. <<https://doi.org/10.1007/s00248-007-9258-6>>.

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 agrônômica 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. <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200015>>.

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S. Produtividade e diluição isotópica de <sup>15</sup>N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016. <<https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000900059>>.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A. DA; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA, R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; SILVA, M. F. DA.; 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. <<https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005>>.

SILVA, M. A. da. **Bactérias diazotróficas e adubação molíbdica na contribuição da fixação biológica de N<sub>2</sub> em cana planta**. 2016. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil, 2016.

SILVEIRA, A. P. D. DA.; SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; LABANCA, E. G.; CIPRIANO, M. A. P. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 313–319, 2016. <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.005>>.

SNA – Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em: <<https://www.sna.agr.br/>>. Acesso em: 02 jan. de 2020.

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.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ- DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 67–72, 1991. <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04323.x>>.

STÜEKEN, E. E.; BUICK, R.; GUY, B. M.; KOEHLER, M. C. Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 666–669, 2015. <<https://doi.org/10.1038/nature14180>>.

SUMAN, A.; SHRIVASTAVA, A. K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J.; YADAV, R. L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, v. 54, n. 1, p. 1–11, 2008. <<https://doi.org/10.1007/s10725-007-9219-6>>.

SYSTAT SOFTWARE. **SigmaPlot for Windows Version 12.0**. San Jose: Systat Software Inc., 2011.

TAULÉ, C.; LUIZZI, H.; BERACOCHEA, M.; MAREQUE, C.; PLATERO, R.; BATTISTONI, F. The Mo- and Fe-nitrogenases of the endophyte *Kosakonia* sp. UYSO10 are necessary for growth promotion of sugarcane. **Annals of Microbiology**, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s13213-019-01466-7>>.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. (Boletim Técnico, 5).

TEJADA-JIMENEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA, A.; CALATRAVA, V.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E.; LLAMAS, A. From the eukaryotic molybdenum cofactor biosynthesis to the moonlighting enzyme MARC. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018. <<https://doi.org/10.3390/molecules23123287>>.

TEJADA-JIMÉNEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA, A.; GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E.; LLAMAS, Á. Molybdenum metabolism in plants. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1191–1203, 2013. <<https://doi.org/10.1039/c3mt00078h>>.

TEJADA-JIMÉNEZ, M.; GIL-DÍEZ, P.; LEÓN-MEDIAVILLA, J.; WEN, J.; MYSORE, K. S.; IMPERIAL, J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M. *Medicago truncatula* Molybdate Transporter type 1 (MtMOT1.3) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under molybdenum deficiency. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1223–1235, 2017. <<https://doi.org/10.1111/nph.14739>>.

TERRA, L. A., DE SOARES, C. P., MENESES, C. H. S. G., TADRA SFEIR, M. Z., DE SOUZA, E. M., SILVEIRA, V.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. Transcriptome and proteome profiles of the diazotroph *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC in response to the sugarcane apoplast fluid. **Plant and Soil**, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s11104-019-04201-y>>.

TIEN, T.; GASKINS, M.; HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016–1024, 1979. <[doi: 10.1128 / AEM.37.5.1016-1024.1979](https://doi.org/10.1128/AEM.37.5.1016-1024.1979)>.

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, 2013. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162013000500009>>.

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. <[doi: 10.1007/s11104-011-1016-3](https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3)>.

VIEIRA-MEGDA, M. X., MARIANO, E., LEITE, J. M., FRANCO, H. C. J., VITTI, A. C., MEGDA, M. M.; KHAN, S. A.; MULVANEY, R. L.; TRIVELIN, P. C. O. Contribution of fertilizer nitrogen to the total nitrogen extracted by sugarcane under Brazilian field conditions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 101, n. 2, p. 241–257, 2015. <<https://doi.org/10.1007/s10705-015-9676-7>>.

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. <[doi: 10.1097/00010694-193401000-00003](https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003)>.

YANAGISAWA, S. Transcription factors involved in controlling the expression of nitrate reductase genes in higher plants. **Plant Science**, v. 229, p. 167–171, 2014. <[doi: 10.1016/j.plantsci.2014.09.006](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.006)>.

YIN, T. T.; PIN, U. L.; GHAZALI, A. H. A. Influence of external nitrogen on nitrogenase enzyme activity and auxin production in *Herbaspirillum seropedicae* (Z78). **Tropical Life Sciences Research**, Malásia, v. 26, n. 1, p. 101–110, 2015.

ZHOU, J.; DENG, B.; ZHANG, Y.; COBB, A. B.; ZHANG, Z. Molybdate in rhizobial seed-coat formulations improves the production and nodulation of alfalfa. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170179>>.



---

## **CAPÍTULO II**

# **ANÁLISE DO PROTEMA DIFERENCIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR RELACIONADA À APLICAÇÃO DE ADUBO MOLIBÍDICO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS**

---

## ANÁLISE DO PROTEOMA DIFERENCIAL DA CANA-DE-AÇÚCAR RELACIONADA À APLICAÇÃO DE ADUBO MOLIBDÍDICO E INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

### RESUMO

Na cultura da cana-de-açúcar, as contribuições na biomassa obtidos pela inoculação são pequenos e inconcisos, principalmente em condições de campo. Por isso, mecanismos de promoção de crescimento de plantas realizados por bactérias (BPCP) têm sido investigados, com o intuito de encontrar alternativas que promovam maior eficiência do processo, além de tentar esclarecer qual(is) deste(s) mecanismo(s) estaria(m) contribuindo de forma mais íntima com o desenvolvimento da cultura. Neste contexto, a avaliação da inoculação associada a micronutrientes como o molibdênio (Mo) e ferro (Fe) que desempenham importante papel nos processos fisiológicos de plantas e de microrganismos e que interferem diretamente em processos chaves que envolvem as contribuições das bactérias para as plantas tem sido sugeridos. Para este tipo de investigação, a análise das proteínas pode explicar e compreender os mecanismos que são reguladores da associação de BPCP e Mo, o que pode orientar o conhecimento das funções, adaptação e melhoria da associação com a cana-de-açúcar, uma vez que as alterações podem ser percebidas na planta e no microbionte. Diante deste contexto, foi realizado um estudo na tentativa de identificar o conjunto de proteínas potencialmente acumuladas em resposta à inoculação e aplicação do Mo na nutrição nitrogenada em folha de cana-de-açúcar. Para avaliar as variações proteômicas na folha +1 moduladas por N, Mo e BPCP na cana-de-açúcar da variedade RB867515 foram cultivadas plantas em substrato enriquecido com 2 % de átomos de  $^{15}\text{N}$  até 100 dias após a germinação. Aqui, foram realizados quatro perfis eletroforético SDS-PAGE da folha +1 da cana-de-açúcar para comparação da aplicação ou não do adubo molibídico em todas as situações a seguir: (A) quando inoculada com *Stentrophomonas* sp. (ST); (B) Quando inoculada com ST e aplicado o adubo nitrogenado; (C) Quando inoculado com um coquetel composto por cinco estirpes de bactérias diazotróficas (GHABH); (D) Quando inoculado com o coquetel GHABH e aplicado o adubo nitrogenado. A proteômica comparativa encontrou 46 conjuntos de proteínas diferenciais, mas apenas 28 foram identificados (60,86%). Nossos resultados demonstraram que a inoculação atua principalmente no acúmulo de proteínas relacionadas a absorção e metabolismo de N, enquanto que a inoculação de BPCP associado ao Mo atua no acúmulo de proteínas diferenciais relacionadas ao metabolismo do enxofre, fotossíntese e mecanismos hormonais, especialmente no que diz respeito às auxinas, ácido abscísico e etileno, na cultura da cana-de-açúcar,. Para a aplicação de ST associada ao Mo as proteínas do domínio de ligação ao DNA (MS-2), invertase ativa da parede celular (MS-3), Membro da família do transportador ABC B19 (MS-8) e componente beta da hemoproteína sulfito redutase (MS-9); e para a aplicação de GHABH associado ao Mo as proteínas semelhantes à metaloteoneína (MG-2) e histona (MG-10) são possíveis biomarcadores funcionais. Esses resultados não apenas aprofundam nossa compreensão da influência do Mo no proteoma da cana-de-açúcar, mas também fornecem novas informações sobre o mecanismo molecular da cultura regulado pelo Mo e por BPCP. Neste sentido, a pesquisa é inovadora e fornece informações dos mecanismos ativados pela planta e pelas bactérias. As proteínas identificadas como biomarcadores possuem potencial para auxiliar no melhoramento da cultura e para condições experimentais que busquem um inoculante que apresente melhores resultados na produtividade da cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Bactérias diazotróficas. Molibdênio. Análise proteômica. SDS-PAGE. Promoção de crescimento.

## DIFFERENTIAL PROTEOME ANALYSIS OF SUGARCANE RELATED TO THE APPLICATION OF MOLIBD FERTILIZER AND INOCULATION OF PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA

### ABSTRACT

In sugarcane culture, the contributions to biomass obtained by inoculation are small and uncertain, mainly in field conditions. For this reason, mechanisms for promoting plant growth carried out by bacteria (BPCP) have been investigated, in order to find alternatives that promote greater efficiency of the process, in addition to trying to clarify which (s) of these (s) mechanism (s) would be (m) contributing more intimately to the development of culture. In this context, the evaluation of inoculation associated with micronutrients such as molybdenum (Mo) and iron (Fe), which play an important role in the physiological processes of plants and microorganisms and which directly interfere in key processes involving the contributions of bacteria to plants been suggested. For this type of investigation, protein analysis can explain and understand the mechanisms that are regulators of the association of BPCP and Mo, which can guide knowledge of the functions, adaptation and improvement of the association with sugarcane, once that changes can be seen in the plant and microbiont. In this context, a study was carried out in an attempt to identify the set of proteins potentially accumulated in response to the inoculation and application of Mo in nitrogen nutrition in sugarcane leaf. To evaluate the proteomic variations in leaf +1 modulated by N, Mo and BPCP in the sugarcane of the RB867515 variety, plants were grown in a substrate enriched with 2% 15N atoms up to 100 days after germination. Here, four SDS-PAGE electrophoretic profiles of the +1 leaf of sugar cane were made to compare the application or not of molybdcic fertilizer in all the following situations: (A) when inoculated with *Stenotrophomonas* sp. (ST); (B) When inoculated with ST and nitrogen fertilizer is applied; (C) When inoculated with a cocktail composed of five strains of diazotrophic bacteria (GHABH); (D) When inoculated with the GHABH cocktail and nitrogen fertilizer is applied. Comparative proteomics found 46 sets of differential proteins, but only 28 were identified (60.86%). Our results showed that inoculation acts mainly on the accumulation of proteins related to N absorption and metabolism, while the inoculation of BPCP associated with Mo acts on the accumulation of differential proteins related to sulfur metabolism, photosynthesis and hormonal mechanisms, especially in what it says regard to auxins, abscisic acid and ethylene, in the cultivation of sugarcane. For the application of ST associated with Mo the proteins of the DNA binding domain (MS-2), active cell wall invertase (MS-3), Member of the ABC B19 transporter family (MS-8) and beta component of hemoprotein sulfite reductase (MS-9); and for the application of GHABH associated with Mo, proteins similar to metalloteonein (MG-2) and histone (MG-10) proteins are possible functional biomarkers. These results not only deepen our understanding of the influence of Mo on the sugarcane proteome, but also provide new information on the molecular mechanism of culture regulated by Mo and by BPCP. In this sense, the research is innovative and provides information on the mechanisms activated by the plant and bacteria. The proteins identified as biomarkers have the potential to assist in improving the crop and for experimental conditions that seek an inoculant that presents better results in the productivity of sugarcane.

**Keywords:** Diazotrophic bacteria. Molybdenum. Proteomic analysis. SDS-PAGE. Growth promotion.

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são definidas como um grupo heterogêneo de procariotos que podem ser de vida livre ou estabelecer associações colonizando a rizosfera das plantas (rizosféricos), a superfície vegetal (epifítico), ou ainda, colonizando internamente os tecidos vegetais (endofíticos) e que contribuem para o crescimento e desenvolvimento dessas culturas de forma direta e/ou indireta (FAN et al., 2011; SANTOYO et al., 2016).

A fixação do N<sub>2</sub> atmosférico (FBN) é a contribuição direta mais estudada, mas são diversos os trabalhos de pesquisa que demonstram outras contribuições diretas por esses organismos como os que influenciam na fertilidade e nutrição das plantas: como a solubilização de P (KALAYU, 2019) e K (ETESAMI; EMAMI; ALIKHANI, 2017), a produção de sideróforos (Fe, Mn, Mo, Zn e B) (JOHNSTONE; NOLAN, 2015); e os que influenciam no estímulo hormonal: como a produção de auxinas (KUNKEL; HARPER, 2018), citocininas, giberelinas, ácido abscísico (KUDOYAROVA; ARKHIPOVA; MELENĚEV, 2015) e redução de etileno (ACC deaminase) (PREMACHANDRA; HUDEK; BRAU, 2016).

Além desses, contribuições indiretas, também podem ser encontradas na literatura como os que influenciam a tolerância à estresses bióticos e abióticos (KAVAMURA et al., 2012; MAJEED; MUHAMMAD; AHMAD, 2018; NUMAN et al., 2018); a indução de resistência à pragas e doenças: como produção de antibióticos, produção de metabólitos fungicos, cianeto de hidrogênio – HCN, indução de resistência sistêmica e enzimas líticas (GLICK, 2012; DUTTA et al. 2014; LUDWIG-MÜLLER, 2015; PREMACHANDRA; HUDEK; BRAU, 2016); e os que influenciam na melhoria da qualidade do solo (MAJEED; MUHAMMAD; AHMAD, 2018).

Na cultura da cana-de-açúcar, alguns desses mecanismos têm sido estudados, principalmente nas regiões tropicais, com o intuito de esclarecer quais mecanismos estariam contribuindo mais intimamente com o crescimento e desenvolvimento da planta, em virtude do número de BPCP encontradas associadas à cultura (ANTUNES et al., 2017) e da tentativa de encontrar um inoculante para a cultura.

Em grande parte dessas pesquisas é possível observar vantagens no desenvolvimento da parte aérea e raiz da cana-de-açúcar quando realizada a inoculação com BPCP, o que resulta em maior produtividade da cultura. No entanto, nem sempre há uma correlação direta com o processo de FBN realizado pelas bactérias associativas, e estes resultados são sempre correlacionados aos demais mecanismos de promoção de crescimento.

Além disso, as contribuições significativas na biomassa de raiz e parte aérea da cultura

pelo processo de associação ainda são considerados são pequenos e inconsisos, principalmente em condições de campo. Por isso, alternativas que promovam maior eficiência do processo no desenvolvimento da cultura têm sido buscadas.

Neste segmento, são sugeridas a avaliação de micronutrientes como o molibdênio (Mo) e o ferro (Fe) que interferem diretamente em processos chaves que envolvem as contribuições das bactérias para as plantas e são considerados essenciais a ambos organismos (KOVÁCS et al., 2015; FORLI et al., 2017; ZHOU et al., 2017).

O molibdênio (Mo) é um oligoelemento aniônico necessário para as plantas e que é encontrado em baixas concentrações no solo (em torno de  $1,8 \text{ mg kg}^{-1}$ ), na forma de minerais primários, óxidos ou outros tipos de minerais a depender do material de origem (ADRIANO, 2001). Nas plantas, é um dos micronutrientes menos exigido apresentando quantidades inferiores a  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de matéria seca (KIRKBY, 2012), no qual para a cultura da cana-de-açúcar, valores entre  $0,40$  a  $0,99 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mo para a variedade RB867515 e de  $0,59$  a  $0,90 \text{ mg kg}^{-1}$  de Mo para a variedade RB92579 são relatados (SANTOS et al., 2019b).

As funções deste micronutriente são ligadas a ativação de enzimas em processos envolvidos na redução e assimilação de N, catabolismo de purina, síntese de ácido abscísico (ABA) e auxinas (AIA) e metabolismo do enxofre tanto em plantas como em BPCP. Ainda, apresenta funções ligadas às bactérias diazotróficas que fazem associação com as plantas e que estão envolvidas na fixação de N.

Para que todas essas enzimas apresentem atividade catalítica e cumpram suas respectivas funções, o Mo deve ser complexado por um composto de pterina formando o cofator de molibdênio (Moco) (BITTNER, 2014) que pode ser ligado às proteínas de ligação, diretamente às enzimas que precisam do molibdênio ou ao domínio de ligação da Moco sulfurase que é a fonte ligante de enxofre terminal do Moco na xantina oxidase/desidrogenase e aldeído oxidase (MENDEL, 2011), e que no momento das reações bioquímicas, apresenta função de transporte de elétrons no centro ativo das enzimas (MENDEL; LEIMKÜHLER, 2015).

Portanto, a fertilização molíbdica torna-se essencial para o manejo da fertilidade do solo ou como uma alternativa para auxiliar no processo da FBN, na assimilação de N via nitrato, e na promoção de crescimento de plantas via estímulo hormonal quando associada à BPCP, uma vez que sua função é essencial para atividade catalítica dessas enzimas.

Como atualmente as avaliações nas BPCP, em geral, são realizadas em meio de cultura e deixam incertezas de qual processo estaria atuando mais intimamente com a planta e o Mo desempenha importante papel nos processos fisiológicos de plantas e de microrganismos e atuam nos mecanismos de promoção de crescimento, faz-se necessário novos estudos que

avaliem qual a resposta da planta no momento da inoculação e/ou quando associado ao Mo.

É neste contexto que a proteômica surge, com o propósito de identificar um conjunto de proteínas que foram acumuladas num dado momento em um tecido específico (KOMATSU, 2019; LIU et al., 2019) com potencial de analisar uma determinada célula, tecido ou organismo que esteja sob qualquer circunstância ecossistêmica (LIBAULT et al., 2017). Essa técnica abrange resultados que podem explicar funções biológicas de um organismo, no ambiente agrícola ou natural, por revelar o perfil proteico de uma cultura (VOELCKEL; GRUENHEIT; LOCKHART, 2017).

A análise das proteínas se faz importante porque estas estão ligadas diretamente à formação de características fisiológicas que regulam fenótipos para se adaptar à determinadas mudanças (FINKA; GOLOUBINOFF, 2013). Por esse motivo, o foco da análise é identificar importantes biomarcadores que expliquem informações contidas em seus genes em nível proteico, mas com uma funcionalização progressiva do genótipo para o fenótipo (MAROLI et al., 2018). A partir dessas conexões existentes na estrutura molecular, bioquímica e fisiológica do organismo alvo, é possível prever resultados complexos e que confere distinção a cada indivíduo (RITCHIE et al., 2015).

Na cultura da cana-de-açúcar, a análise da proteômica já é utilizada para explicar situações que envolvam interações entre a cana-de-açúcar e microrganismos com o intuito de descrever alterações no perfil metabólico da cultura (AGUIAR et al., 2018), entender a função das proteínas na associação (LERY et al., 2008), compreender os mecanismos que controlam o estabelecimento de tais associações (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017; MAY et al., 2019), e identificar proteínas biomarcadoras na relação entre planta-microbionte e que auxiliam na sinalização (IMAM et al., 2017). Também pode ser utilizada para conhecer o perfil proteômico dos microrganismos quando submetidos à associação (CORDEIRO et al., 2013) e as respostas desses desses microbiontes (TERRA et al., 2019).

Portanto, a compreensão dos mecanismos proteicos que são reguladores da associação de BPCP e aplicação de Mo pode orientar estudos nos conhecimentos das funções determinantes para adaptação e melhorar a associação na cana-de-açúcar, uma vez que as alterações podem ser percebidas na planta e no microbionte. Talvez, o micronutriente pode estar envolvido em outros efeitos que não serão observados com outros parâmetros de crescimento, e a combinação com a análise proteômica pode ser uma visão holística do processo de associação de microrganismos, molibdênio e a cana-de-açúcar.

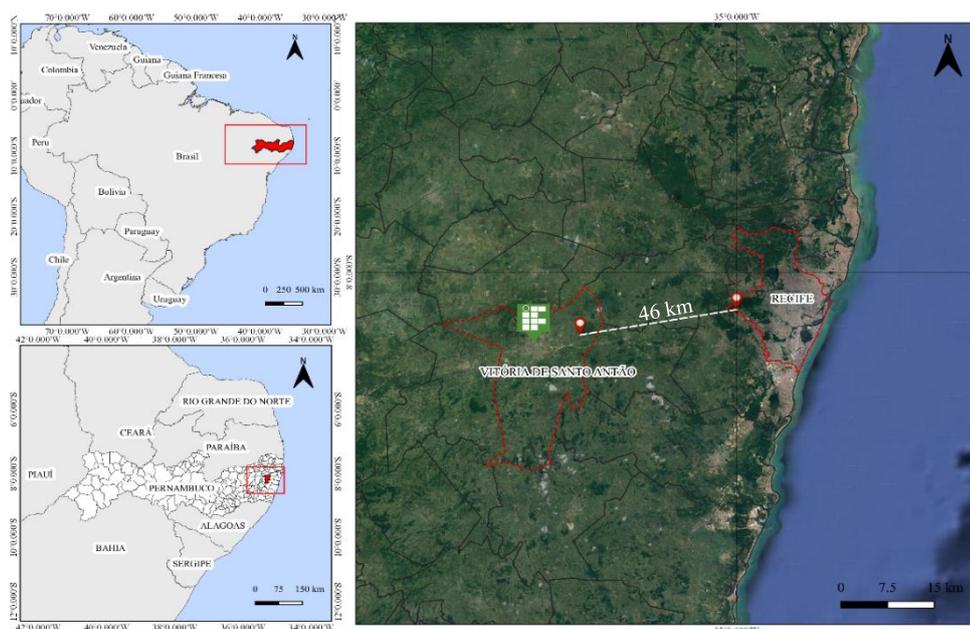
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Execução do experimento

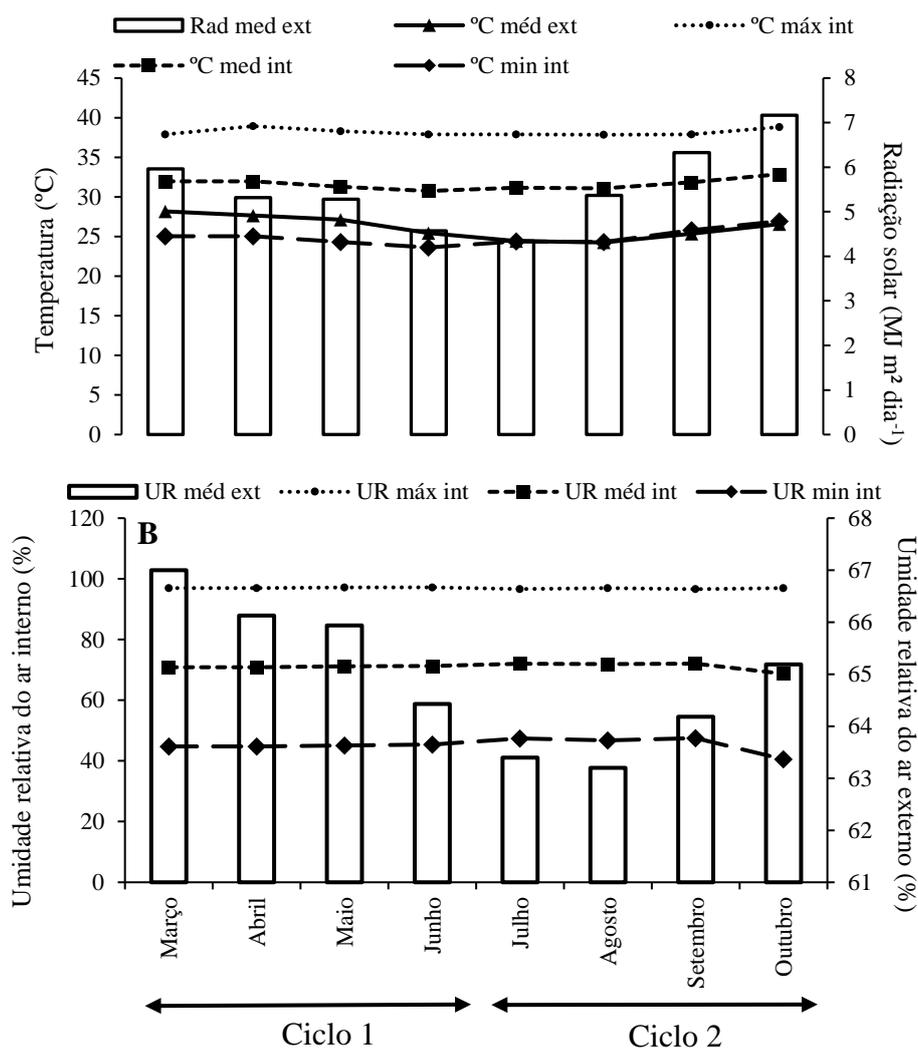
#### 2.1.1 Condução experimental

O experimento foi conduzido no período de março a outubro de 2019, totalizando 200 dias de avaliação experimental, na casa de vegetação do Instituto Federal de Pernambuco (IFPE), situado na cidade de Vitória de Santo Antão, Estado de Pernambuco com coordenadas geográficas 8° 6' 3802'' Sul e 35° 17' 39095'' Oeste (Figura 01). O município tem altitude de 157 m, com clima predominante, segundo a classificação de Köppen (1948), As' – clima tropical com precipitações no outono e inverno, e com temperatura média anual de 24,1 °C (APAC, 2019a).

Para mensuração das temperaturas e umidades internas da casa de vegetação, foi utilizado termo-higrômetro digital modelo 7666.02.0.00 com faixa de medição de 0 – 70 °C de temperatura e 15% a 95% de umidade relativa. Para a mensuração das variáveis agrometeorológicas externas foram obtidos os dados da estação meteorológica da Agência Pernambucana de Águas e Clima (APAC) (APAC, 2019b) situado no bairro do Livramento, com coordenadas geográficas 8° 7' 42.96" Sul e 35° 18' 10.8" Oeste, à 4,2 km do IFPE campus Vitória de Santo Antão. A radiação, temperatura e umidade relativa médios do experimento foram 5,54 MJ m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>, 31,62 °C e 71,11%, respectivamente (Figura 02).



**Figura 01.** Mapa do Estado de Pernambuco, com destaque para o município de Vitória de Santo Antão e para o Instituto Federal de Pernambuco, com localização geográfica da casa de vegetação utilizada no experimento. (Fonte: Elaborado pelo autor a partir da base de dados do Instituto Brasileiro de Geografia e estatística – IBGE e do Google Earth).



**Figura 02.** Dados meteorológicos do período do ensaio experimental realizado em estufa, na cidade de Vitória de Santo Antão – PE. (A) Temperatura média externa e temperatura máxima, média e mínima (°C) (B) umidade relativa do ar média externa e umidade relativa do ar máximo, médio e mínimo (%). (Fonte: Elaborada pela autora a partir da base de dados da Agência Pernambucana de Águas e Clima – APAC e coleta de dados experimentais).

Os tratamentos foram constituídos a partir de cinco doses de N (0; 1,96; 2,94; 3,92 e 4,9 g vaso<sup>-1</sup> de N equivalentes a 0; 40,4; 60,2; 80,7 e 100,9 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente), duas doses de molibdênio (0 e 0,9 g vaso<sup>-1</sup> de Mo equivalentes a 0 e 1,5 kg ha<sup>-1</sup> de Mo, respectivamente) e três inoculações (com inoculante ST – UAGC 869 (*Stenotrophomonas* sp.); cinco estirpes de bactérias diazotróficas que compuseram o inoculante GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus* – BR11281T; H: *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335; A: *Nitrospirillum amazonense* – BR11145; B: *Burkholderia tropica* – BR11366T; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*) – BR11504T), e um tratamento controle sem aplicação do N, Mo e bactérias.

Como dose padrão foi escolhida a extração da cana (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus* – BR11281T; H: *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335; A: *Nitrospirillum*

*amazonense* – BR11145; B: *Burkholderia tropica* – BR11366T; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*) – BR11504T), -de-açúcar de 3,92 g vaso<sup>-1</sup> de N e de 0,9 g vaso<sup>-1</sup> de Mo, da planta em que foi aplicado apenas o nutriente na pesquisa de Silva (2016). Para as doses de N, foi realizada a redução ou incremento em 25%, como segue: 0%; 50%, 75%, 100% (dose padrão) e 125% da extração da planta e obtidas as doses de N utilizadas a partir da dose padrão. Para os inoculantes, foram escolhidos o que apresentou melhor resultado na pesquisa de Silva (2016) e o coquetel de inoculantes desenvolvido pela Embrapa Agrobiologia no ano de 2008 e indicado para a cultura da cana-de-açúcar.

Os tratamentos escolhidos para extração de proteínas totais foram escolhidos com base nos melhores resultados de biomassa seca de parte aérea da cana planta aos 100 DAG. Neste contexto, os tratamentos foram constituídos a partir da interação de duas doses de nitrogênio (0 e 2,94 g vaso<sup>-1</sup> de N equivalentes a 0 e 60,2 kg ha<sup>-1</sup> de N, respectivamente), duas doses de molibdênio (0 e 0,9 g vaso<sup>-1</sup> de Mo equivalentes a 0 e 1,5 kg ha<sup>-1</sup> de Mo, respectivamente), inoculação ou não de ST ou GHABH, o que totalizou 8 tratamentos, como apresentado na Tabela 01.

**Tabela 01.** Fertilizantes e inoculantes utilizados como tratamentos para resposta da cana planta em casa de vegetação.

ID	Tratamentos	Correspondência	Representação
T1	Inoculante UAGC 869	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	+ST
T2	UACG 869 + Molibdênio	<i>Stenotrophomonas</i> sp. + 1,5 g ha <sup>-1</sup> de Mo	+Mo +ST
T3	UACG 869 + Dose Nitrogenada	<i>Stenotrophomonas</i> sp. + 1,5 g vaso <sup>-1</sup> de Mo + 2,94 g vaso <sup>-1</sup> de N	+ N +ST
T4	Mo + UACG 869 + Dose Nitrogenada	<i>Stenotrophomonas</i> sp. + 1,5 g vaso <sup>-1</sup> de Mo + 2,94 g vaso <sup>-1</sup> de N G: <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	+N +Mo +ST
T5	Conjunto de inoculantes	A: <i>Azospirillum amazonense</i> B: <i>Burkholderia tropica</i> H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	+GHABH
T6	Conjunto de inoculantes + Molibdênio	GHABH + 1,5 g vaso <sup>-1</sup> de Mo	+ Mo +GHABH
T7	Conjunto de inoculantes + Dose Nitrogenada	GHABH + 2,94 g vaso <sup>-1</sup> de N	+ N +GHABH
T8	Conjunto de inoculantes + Molibdênio + Dose Nitrogenada	GHABH + 1,5 g vaso <sup>-1</sup> + 2,94 g vaso <sup>-1</sup> de N	+GHABH + Mo +N

Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.

As parcelas experimentais foram constituídas de vasos com capacidade de 50 L ou 0,050 m<sup>3</sup>. Na parte inferior central dos vasos, foram instalados drenos com 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 drenada 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 tipo cascalhinho (nº 12) e 74 kg de substrato de areia lavada calculado para massa total do tonel, excluído a bordadura de 4 cm.

O delineamento experimental utilizado foi em bloco ao acaso em esquema fatorial 5 x 2 x 3 (N x Mo x Bac), com 4 repetições, totalizando 120 parcelas experimentais.

A caracterização química e física do substrato de areia lavada foi realizada em três amostras compostas oriundas de nove amostras simples coletadas aleatoriamente (Tabela 02). O substrato de crescimento apresentou as características a seguir: classe textural arenosa ( $931,30 \text{ g kg}^{-1}$ ), alta porosidade (48%), baixo pH (4,4), baixa CTC ( $2,93 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ), baixo teor de matéria orgânica ( $2,09 \text{ g kg}^{-1}$ ) e baixa quantidade de nutrientes ( $0,73 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ), de modo que a fonte principal de N para as plantas fosse o adubo nitrogenado ou o  $\text{N}_2$  atmosférico. Para as análises químicas do substrato foram utilizadas as metodologias propostas pela EMBRAPA (2017), Walkley; Black (1934), Tedesco et al. (1995). Para as análises físicas do substrato foram seguidas as metodologias descritas pela EMBRAPA (2017), Bouyoucos (1926) e Kiehl (1979).

**Tabela 02.** Caracterização química e física da areia lavada utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação

<b>Atributos químicos do solo</b>		<b>Atributos físicos do solo</b>	
CE (dS m <sup>-1</sup> )		Classe textural	Arenosa
pH <sub>água</sub> (1:2,5)	4,4	Areia total (g kg <sup>-1</sup> )	931,30
Ca <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,54	Areia muito grossa (g kg <sup>-1</sup> )	209,18
Mg <sup>2+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,18	Areia grossa (g kg <sup>-1</sup> )	383,70
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,72	Areia média (g kg <sup>-1</sup> )	268,00
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,02	Areia fina (g kg <sup>-1</sup> )	54,79
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,02	Areia muito fina (g kg <sup>-1</sup> )	15,66
P (mg dm <sup>-3</sup> )	44	Silte (g kg <sup>-1</sup> )	25,30
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )		Argila (g kg <sup>-1</sup> )	43,40
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )		Ds (g cm <sup>3</sup> )	1,7
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )		Dp (g cm <sup>3</sup> )	2,65
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )		PT (%)	48
Mo (mg dm <sup>-3</sup> )		θ <sub>cc</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	10
COT (g kg <sup>-1</sup> )	2,09	θ <sub>pmp</sub> (cm <sup>3</sup> cm <sup>-3</sup> )	0,05
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg dm <sup>-3</sup> )			-
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg dm <sup>-3</sup> )			-
<sup>15</sup> N (%)	0,58		-
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,73		-
t (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,44		-
T (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,93		-
m (%)	98,63		-
V (%)	24,91		-
PST (%)	2,74		-

Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.

A caracterização química da água utilizada está apresentada na Tabela 03. Todos os procedimentos metodológicos da química da água foram realizados conforme APHA (2012). A água utilizada no experimento apresentou as características a seguir: Baixa condutividade elétrica (0,3225 dS m<sup>-1</sup>), pH neutro (6,6), baixa quantidade de amônia (<0,04 mg L<sup>-1</sup>) e baixa quantidade de nitrato (9,7 mg L<sup>-1</sup>) de modo que a principal fonte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fosse o adubo.

**Tabela 03.** Caracterização da água utilizada no ensaio experimental em casa de vegetação

<b>Atributos químicos da água</b>	
CE (dS m <sup>-1</sup> )	0,3225
pH <sub>SM4500H+B</sub>	6,6
Ca <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1
Mg <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1,8
Al <sup>3+</sup> total (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05
Na <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	53,1
K <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	3,5
Cl <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	37
Fe (mg L <sup>-1</sup> )	0,2
Mn (mg L <sup>-1</sup> )	<0,01
Cu (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05
Zn (mg L <sup>-1</sup> )	<0,05
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	1
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	9,7
Amônia em NH <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	<0,04
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	44
Sólidos totais dissolvidos (mg L <sup>-1</sup> )	126
Dureza total em CaCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	9,9
Turbidez (uT)	4,6

Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais.

### 2.1.2 Correção do substrato

Após a caracterização completa do substrato, o mesmo foi corrigido com calcário dolomítico (37,85% de CaO; 16,73% de MgO; 77,76% de PRNT) antes da instalação do experimento. 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. O calcário foi incorporado de forma homogênea a toda a massa de solo, que foi umedecido e incubado durante 15 dias. Após esse período, o substrato foi reavaliado, apresentando faixa de pH em água de 6,0.

### 2.1.3 Enriquecimento do solo com <sup>15</sup>N

O substrato foi enriquecido utilizando o fertilizante do tipo nitrato de amônio (NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>) 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, (0,65 g nitrato de amônio com 2 % de átomos de <sup>15</sup>N por parcela).

Para facilitar a aplicação do fertilizante e a marcação do substrato, o  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  foi diluído para fazer uma solução de  $^{15}\text{N}$ -nitrato de amônio com volume final de 500 ml. O volume da solução foi calculado, conforme a 80 % da capacidade de armazenamento da água no substrato, de modo que não houvesse drenagem da solução após a aplicação e consequente perda do  $^{15}\text{N}$ .

Para a aplicação da solução enriquecida com  $^{15}\text{N}$ -nitrato de amônio foram adicionados 18,5 kg de areia no vaso, no qual foi aplicado lentamente 125 mL da solução previamente preparada com posterior homogeneização do material até que o substrato permanecesse umedecido. O procedimento foi realizado até completar o volume total do vaso com 74 kg de areia.

Após a aplicação da solução, todos os vasos foram cobertos com lona plástica escura e incubados durante 30 dias. Após esse período, o substrato foi reavaliado, apresentando faixa de de 1,02 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ . Esse processo visou elevar a abundância de  $^{15}\text{N}$  do substrato, de modo que permanecesse superior quando comparado com da atmosfera (0,3663%). Dessa forma, todos os tratamentos receberam pequena quantidade de N, que não inibisse na associação das bactérias inoculadas, mas que marcasse homogeneamente todo o solo com o adubo  $^{15}\text{N}$ -nitrato de amônio.

#### 2.1.4 Inoculação

Para o tratamento com inoculantes, foram utilizados um inoculante simples composto da estirpe UAGC 869 (*Stenotrophomonas* sp.) e um coquetel com cinco estirpes de bactérias diazotróficas que compuseram o inoculante GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus* – BR11281T; H: *Herbaspirillum seropedicae* – BR11335; A: *Nitrospirillum amazonense* – BR11145; B:) – BR11504T).

A *Stenotrophomonas* sp. foi isolada da variedade de cana-de-açúcar *Burkholderia tropica* – BR11366T; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* RB867515, aos 4 meses de idade da planta e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG/UFRPE).

A estirpe é uma bactéria diazotrófo rizosférico que apresenta alta capacidade de produção de ácido indolacético ( $43,24 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), quorum sensing e de solubilizar fosfato inorgânico (2 mm) (LIMA et al., 2018). A estirpe também apresentou os melhores resultados para produção de biomassa da parte aérea, biomassa de raiz e atividade da nitrogenase na cana-de-açúcar entre as bactérias inoculadas e avaliadas na pesquisa de Lima et al. (2018) e Silva (2016).

O coquetel de inoculantes foi constituído por cinco bactérias que foram previamente testadas para FBN e produtividade e selecionadas por Oliveira et al. (2003). As estirpes são pertencentes

ao banco de coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Agrobiologia, do Instituto de pesquisa científica em Seropédica, Rio de Janeiro e são indicadas para a cultura da cana-de-açúcar.

A *Gluconacetobacter diazotrophicus* foi isolada raízes e colmos de espécies de *Saccharum* sp. nos estados de Pernambuco, Alagoas, São Paulo e Minas Gerais (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988). Na cana-de-açúcar é uma bactéria dependente de propagação vegetativa capaz de crescer em pH 2,5 – 3,0, mas o ideal 5,5 (STEPHAN et al. 1991) e produz enzima extracelular (invertase) (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988). Diazotrófo e endófito obrigatório encontrada nos espaços intercelulares de plantas de diversas famílias (CHAWLA et al., 2014) sendo capaz de produzir AIA no desenvolvimento inicial das raízes ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (CHAVES et al., 2015), solubilizar médias quantidades de fosfato (1,0 mm) e de zinco (2 mm) (INTORNE et al., 2009), e biocontrole de patógenos (SARAVANAN et al., 2008). Além disso, apresenta intensa associação com fungos micorrízicos (MEENAKSHISUNDARAM; SANTHAGURU, 2011) e seu proteoma é bastante estudado em associação com a cana-de-açúcar (LERY et al., 2011).

O *Herbaspirillum seropedicae* foi identificado inicialmente em raízes esterilizadas de milho, sorgo e arroz (BALDANI et al. 1984), mas foi isolada da variedade de cana-de-açúcar SP701143 (OLIVEIRA et al., 2003). Diazotrófo e endófito obrigatório habitam espaços intercelulares da ponta das raízes jovens (CANELLAS et al., 2017) sendo comumente estudada em plantas de cana-de-açúcar (CHAVES et al., 2015), milho (CANELLAS et al., 2013) e arroz (BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2011). Apresenta baixa produção de AIA ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (YIN; PIN; GHAZALI, 2015), alta produção de agentes antifúngicos ou antibacterianos (proteção) e sideróforos (LOACES; FERRANDO; SCAVINO, 2011; MONTEIRO et al., 2012). Também apresenta estudos do seu proteoma em associação à cana-de-açúcar.

A *Nitrospirillum amazonense* foi identificada inicialmente de raízes de *Brachiaria brizantha* (MAGALHÃES et al., 1983), mas essa estirpe foi isolada da variedade de cana-de-açúcar SP775181 (OLIVEIRA et al., 2003). Diazotrófo e endofítico facultativo apresenta melhor crescimento em solos de pH 5,5 – 7 (DÖBEREINER; MARRIEL; NERY, 1976), alta produção de AIA ( $49,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (TERRA et al., 2019), produção média de giberelina (ILYAS; BANO, 2010) e produtora de citocinina e ácido abscísico, mas o efeito destes é pouco estudado na planta (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979; COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008 et al.(1976), e por isso é considerada uma bactéria de múltiplo mecanismos.

A *Burkholderia tropica* inicialmente identificada em plantas de arroz, cana-de-açúcar e batata (BALDANI et al., 1995), mas foi isolada de brotos da variedade SP711406 sendo posteriormente propostas duas novas espécies: *B. brasiliensis* e *B. tropicalis* (OLIVEIRA et al.,

2003; BALDANI; BALDANI, 2005). Por este motivo, este grupo difere na tolerância ao pH, uso de fontes de carbono, tipo de colônia e tolerância osmótica (BALDANI; BALDANI, 2005). Diazotrófo e endofítico obrigatório apresenta baixa produção de AIA ( $11,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), Alta solubilização de fosfato (4,0 mm) e alta produção de sideróforos (18,5 mm) (CASTRO-GONZÁLEZ et al., 2011). Essas estirpes demonstram alta frequência de ocorrência em plantas de cana-de-açúcar e arroz, mas por apresentarem características semelhantes às *Pseudomonas* sp. que causam manchas, podridão, murcha, nanismo, estria mosqueada na cana-de-açúcar não é bem aceita como inoculante.

O *Herbaspirillum rubrisubalbicans* foi primeiramente identificado em colmos de cana-de-açúcar do estado de PE (DÖBEREINER et al. 1990) e geralmente, são encontradas colonizando o mesófilo foliar dessa planta (MONTEIRO et al., 2012). Diazotrófo e endofítico obrigatório apresentam muitas características semelhantes às *Pseudomonas rubrisubalbicans* que causam em algumas cultivares de cana-de-açúcar a estria mosqueada (OLIVARES et al., 1997).

Todas as bactérias foram repicadas em meio DYGS sólido pH 6,0 e específico para bactérias diazotróficas (RODRIGUES NETO et al., 1986). Após o crescimento as bactérias foram novamente repicadas e multiplicadas em DYGS líquido pH 6,0 para realização da inoculação conforme Araújo et al. (2010).

Os colmos sementes, então, foram mergulhados separadamente por 30 minutos em solução com densidade de  $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  para cada estipe em estudo e posteriormente agitados a cada 10 minutos em recipiente com capacidade para 30 L, mantendo a temperatura da solução próxima dos  $25^\circ\text{C}$  (ARAÚJO et al., 2010).

Após a inoculação das bactérias, os colmos sementes inoculados foram separados para o plantio no período da noite em horários semelhantes.

### **2.1.5 Plantio da cana planta**

Para condução do experimento foram utilizados colmos sementes da variedade de cana de- açúcar RB867515 por ser a variedade mais plantada nos canaviais brasileiros (RIDESA, 2015) e já ser identificada como uma variedade responsiva à inoculação de microrganismos promotores de crescimento (SCHULTZ et al. 2012; PEREIRA et al. 2013).

Os rebolos sementes foram obtidos na Usina São José Agroindustrial na forma de mini-rebolos, medindo aproximadamente 3 cm de comprimento, com uma gema viável.

Os colmos sementes inoculados e não inoculados seguiram para o plantio, distribuídos quatro colmos por vaso, dispostos em dois sulcos com aproximadamente 10 cm de profundidade

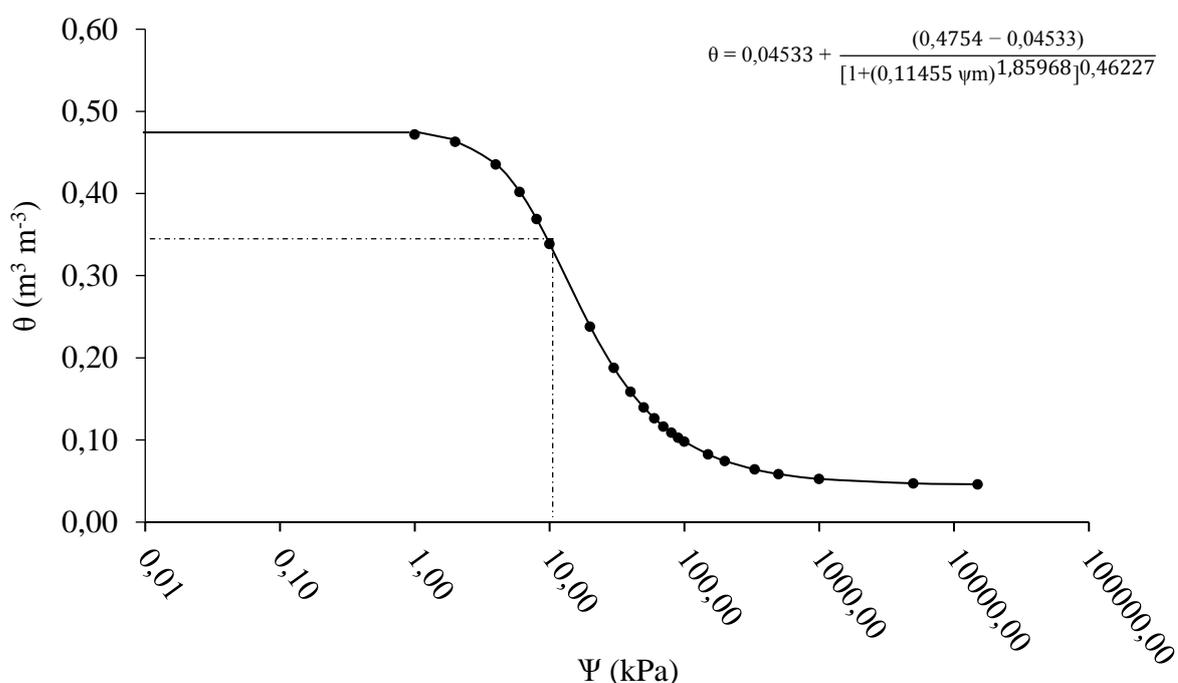
e cobertos com o substrato do próprio vaso. Posteriormente, após a brotação das plantas, foi realizado o desbaste, deixando apenas uma planta para condução do experimento.

O ciclo de cana planta foi conduzido até os 100 dias após a brotação das plantas (DAG), de forma que, o volume do vaso não limitasse o desenvolvimento das variedades em casa de vegetação.

### 2.1.6 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. 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 do primeiro bloco tensiômetros na profundidade de 30 cm, que com auxílio do tensímetro analógico e da Curva Característica de Retenção de Água do Solo (CCRAS) (Figura 03), o valor de tensão obtidos foi transformado em volume de água necessários para reposição da umidade próxima à 80 % da capacidade máxima de adsorção de água do solo. Para determinar 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 03.** Modelo de ajuste para o teor de água ( $\theta$ ) em função do potencial mátrico ( $\Psi_m$ ) para o substrato arenoso utilizado no experimento de cana-de-açúcar. Curva de Retenção de Água no Solo representada pela equação de Van Genuchten. (Fonte: Elaborada pela autora a partir da coleta de dados experimentais).

### 2.1.7 Nutrição

Para o manejo nutricional da cana-de-açúcar foram produzidas soluções padrões constituídas das doses de Mo e N equivalente as doses utilizadas. Como fonte de N foi utilizado o nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) enriquecido com 2 % de átomos de  $^{15}\text{N}$ . Para o Molibdênio foi utilizado o ácido molíbdico.

Para os demais nutrientes, foi formulada uma solução com base em Arnon & Hoagland (1950) por ser a solução para sistemas hidropônicos atualmente mais utilizada. A solução formulada e utilizada no experimento continha os demais macronutrientes e micronutrientes, com exceção do N e Mo.

A composição química da solução indicada pelos autores 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.

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.

Nesses intervalos, era realizada a irrigação diária das plantas. A aplicação foi realizada com regadores de capacidade de 1 L 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  $\text{dS m}^{-1}$ . Durante a realização do ensaio experimental, os valores de pH (6,2 a 6,8) e CE (1,2 a 1,9  $\text{dS m}^{-1}$ ) das soluções nutritivas permaneceram na faixa permitida, não necessitando ajuste.

## 2.2 Análises laboratoriais

### 2.2.1 Coleta do material

Com o intuito de investigar a resposta proteica da cana-de-açúcar à inoculação e à aplicação molíbdica foram coletados os terços médios das folhas +1 no horário após às 14h. As amostras coletadas foram identificadas e imediatamente imersas em nitrogênio líquido. Após o término da coleta, os materiais coletados foram armazenados a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

### **2.2.2 Extração de proteínas**

Para a extração total das proteínas solúveis totais foliares da cana-de-açúcar foi utilizado o método fenólico de Hurkman e Tanaka (1986) modificado e adaptado para a cultura por Boaretto (2012). Desta forma, foram realizadas as seguintes comparações no gel conforme apresentado na Tabela 04:

**Tabela 04.** Descrição dos tratamentos utilizados na montagem do gel SDS-PAGE de cana-de-açúcar aos 100 DAG

<b>Fator</b>		<b>Tratamento 01</b>		<b>Tratamento 02</b>	
Comparação A	Nitrogênio	0 g vaso <sup>-1</sup>	X	0 g vaso <sup>-1</sup>	
	Molibdênio	0 g vaso <sup>-1</sup>		0,9 g vaso <sup>-1</sup>	
	Bactéria	<i>Stenotrophomonas</i> sp.		<i>Stenotrophomonas</i> sp.	
	Representação	- N - Mo + ST		- N + Mo + ST	
<b>Fator</b>		<b>Tratamento 03</b>		<b>Tratamento 04</b>	
Comparação B	Nitrogênio	2,94 g vaso <sup>-1</sup>	X	2,94 g vaso <sup>-1</sup>	
	Molibdênio	0 g vaso <sup>-1</sup>		0,9 g vaso <sup>-1</sup>	
	Bactéria	<i>Stenotrophomonas</i> sp.		<i>Stenotrophomonas</i> sp.	
	Representação	+ N - Mo + ST		+ N + Mo + ST	
<b>Fator</b>		<b>Tratamento 05</b>		<b>Tratamento 06</b>	
Comparação C	Nitrogênio	0 g vaso <sup>-1</sup>	X	0 g vaso <sup>-1</sup>	
	Molibdênio	0 g vaso <sup>-1</sup>		0,9 g vaso <sup>-1</sup>	
	Bactéria	Conjunto de inoculantes		Conjunto de inoculantes	Conjunto de inoculantes
		G:		G:	G:
		<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>		<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
		H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i>		H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
		A: <i>Azospirillum amazonense</i>		A: <i>Azospirillum amazonense</i>	A: <i>Azospirillum amazonense</i>
		B: <i>Burkholderia tropica</i>		B: <i>Burkholderia tropica</i>	B: <i>Burkholderia tropica</i>
		H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>		H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>
		Representação		- N - Mo + GHABH	- N + Mo + GHABH
<b>Fator</b>		<b>Tratamento 07</b>		<b>Tratamento 08</b>	
Comparação D	Nitrogênio	2,94 g vaso <sup>-1</sup>	X	2,94 g vaso <sup>-1</sup>	
	Molibdênio	0 g vaso <sup>-1</sup>		0,9 g vaso <sup>-1</sup>	
	Bactéria	Conjunto de inoculantes		Conjunto de inoculantes	Conjunto de inoculantes
		G:		G:	G:
		<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>		<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
		H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i>		H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	H: <i>Herbaspirillum seropedicae</i>
		A: <i>Azospirillum amazonense</i>		A: <i>Azospirillum amazonense</i>	A: <i>Azospirillum amazonense</i>
		B: <i>Burkholderia tropica</i>		B: <i>Burkholderia tropica</i>	B: <i>Burkholderia tropica</i>
		H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>		H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	H: <i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>
		Representação		+ N - Mo + GHABH	+ N + Mo + GHABH

Fonte: Elaborada pela autora.

As extrações de proteínas solúveis totais foram realizadas em bulkar e aproximadamente 100 mg de material vegetal de cada amostra foram utilizados, totalizando 300 mg. O total das amostras foi macerado em nitrogênio líquido em cadinho até ponto de pó fino.

Em seguida, foram adicionados 3,0 mL de solução tampão de extração (Tampão Tris HCl 0,5 M, pH 7,5; sacarose 0,7 M, KCl 0,1M, EDTA 50mM, fenilmetanosulfonilfluoreto (PMSF) 2 mM,  $\beta$  mercaptoetanol 2%. O material foi homogeneizado e mantido sob agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min. Em seguida, foram adicionados 3,0 mL de fenol saturado com Tris-HCl (pH 7 - 8), e os tubos foram novamente mantidos em agitação constante a 70 rpm a 4°C por 30 min.

Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 10.000xg por 20 min a 4°C e o sobrenadante (fase orgânica) foi coletado e transferido para um novo tubo. Esse procedimento foi repetido até que todo o sobrenadante fosse retirado para o novo tubo.

Ao novo tubo, foi adicionado acetato de amônio 0,1 M dissolvido em metanol P.A. gelado cinco vezes o volume encontrado no tubo. Os tubos foram mantidos a -20°C durante 16 h (overnight) para precipitação das proteínas.

As amostras foram centrifugadas a 16.000xg por 30 min a 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O precipitado (pellet) foi lavado sob centrifugação a 16.000xg por 30 min a 4°C com 0,1 M de acetato de amônio dissolvido em metanol P.A. gelado, uma vez com metanol P.A. gelado e uma vez com acetona P.A. gelada.

Antes de cada centrifugação, os tubos permaneceram por 1 h a -20°C. No final das lavagens, os tubos permaneceram abertos, acondicionados em gelo, em câmara de fluxo laminar até a secagem completa do pellet. Após secagem, os pellets foram solubilizados em solução de ureia 2 M e tioureia 7 M e submetidos a sonicação (40 % amplitude, 5 on e 15 off) no laboratório de biologia molecular do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste – CETENE. Por fim as amostras foram armazenadas à -80°C até o uso.

A quantificação das proteínas totais foi realizada de acordo com o kit 2-D Quant KIT a partir de 5  $\mu$ l de amostra.

### **2.2.3 Eletroforese unidimensional**

Os extratos proteicos obtidos a partir da folha da cana-de-açúcar foram submetidos à técnica de eletroforese em gel horizontal de poliacrilamida (SDS-PAGE), no tamanho 20 x 20. Para isto foi utilizado o gel empilhador “stacking gel” e o gel separador “running gel” a 12% em sistema tampão Tris-APS-TEMED.

Foram aplicadas alíquotas contendo 50 µg de proteínas totais em cada poço e junto às amostras foi aplicado 10 µL de marcador de baixo peso molecular (Low marker- GE).

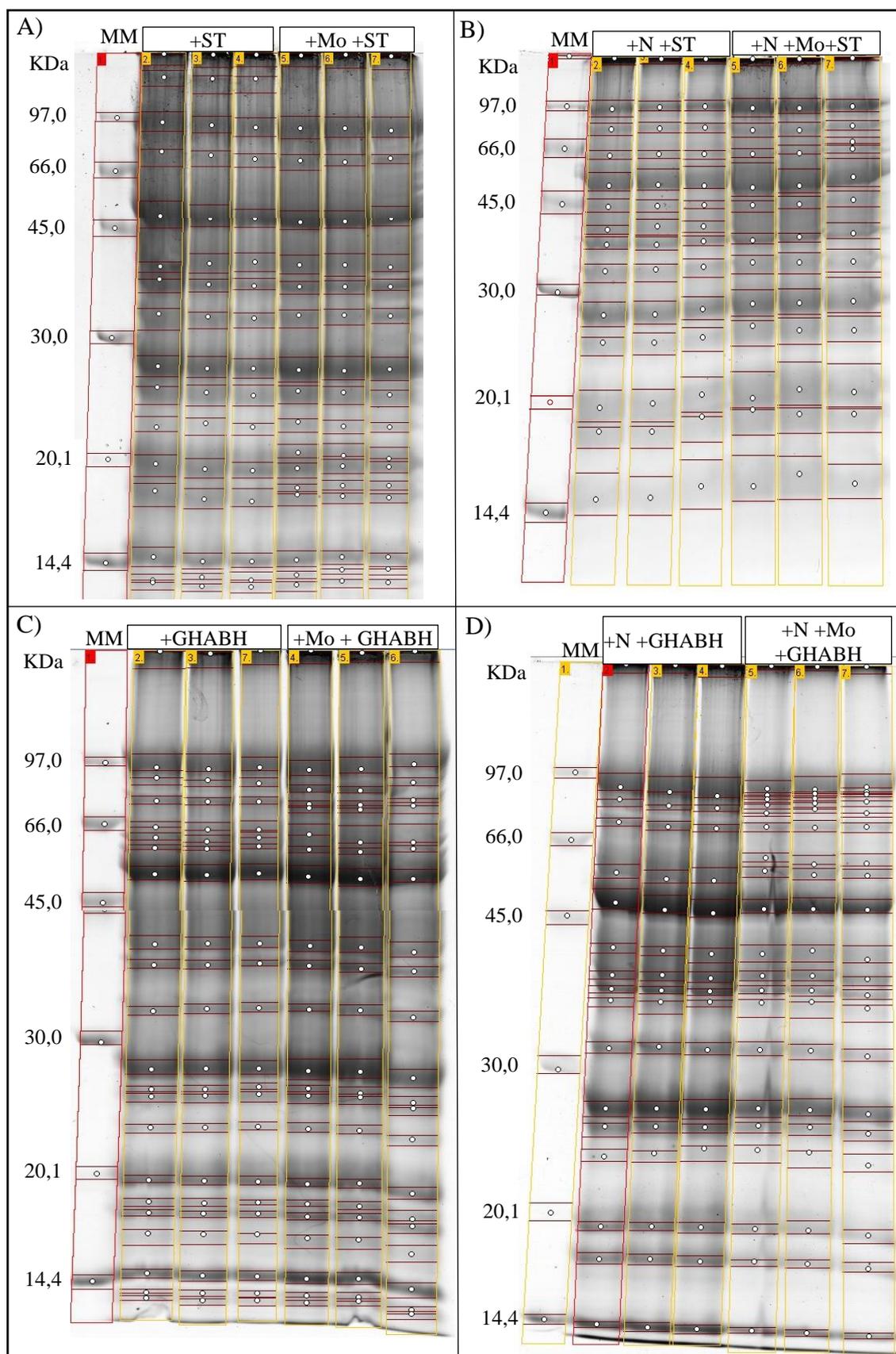
Os géis foram submetidos à eletroforese realizada em duas etapas: a) 300 V, 15 mA/por gel por 20 minutos; b) 150 V, 30 mA/por gel por três horas. Os géis obtidos passaram pelo processo de fixação das proteínas em solução contendo 40 % etanol, 10 % ácido acético e 50 % água destilada, por 20 minutos. Foram lavados em água destilada e corados com solução 0,025% de Azul de Coomassie Brilant Blue G-250, por 12 horas, sendo posteriormente descorados por lavagens sucessivas com solução de água destilada.

#### **2.2.4 Digitalização, análise de imagens e seleção de bandas diferenciais**

Os géis foram escaneados em scanner de transparência utilizando a plataforma LabScan 6.0 GE. As imagens obtidas foram analisadas no programa Gel analyser 19.1 software (<http://www.gelanalyser.com/>) utilizando como parâmetro a intensidade e volume bruto de cada banda, em triplicata, em comparação com o marcador de peso molecular, o que permitiu selecionar as diferenças mais contrastantes entre os tratamentos.

Todas as amostras foram submetidas aos mesmos parâmetros de comparação da análise para detecção de bandas diferenciais, com inspeção visual para eliminar bolhas interferentes e artefatos de coloração (Figura 04).

A partir dos valores de intensidade determinados no programa, foi realizada uma análise estatística em delineamento inteiramente casualizado no programa SAS (*Statistical Analysis System*, 1999), versão 2.0. As bandas com diferenças significativas na ANOVA ( $p \leq 0,05$ ) foram selecionadas e excisadas para análise de espectrometria de massas e identificação utilizando ferramentas de bioinformática.



**Figura 04.** Perfil eletroforético de extração de proteínas solúveis totais em SDS-PAGE de cana-de-açúcar da cultivar RB867515 aos 100 dias após a germinação (A) com aplicação de Mo e inoculadas com bactérias ST (*Stenotrophomonas* sp.); (B) com aplicação aplicação de Mo e inoculadas com bactérias ST (*Stenotrophomonas* sp.); (B) com aplicação de N e Mo e inoculação com bactérias *Stenotrophomonas* sp. (C) com aplicação de Mo e inoculação de GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*). MM: Marcador de proteína de baixo peso molecular (Low marker- GE). Os pontos escuros indicam as bandas intensificadas, e os claros, as que diminuíram em consequência da adição do micronutriente e de inoculantes. (Fonte: Elaborada pela autora).

### 2.2.5 Digestão e identificação de proteínas por espectrometria de massas (MALDI-TOF-TOF)

Os fragmentos do gel SDS-PAGE contendo bandas de proteínas totais foram excisados manualmente dos géis e incubados em uma solução de descoloração contendo 50% de acetonitrila e  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM durante 18 h em temperatura ambiente.

Em seguida, as proteínas foram submetidas a uma reação de redução com solução de 10 mM de DTT (Ditiotreitol) em 25 mM de bicarbonato de amônio e incubadas por 1 hora à 56°C. Logo após, o excesso de líquido foi retirado e adicionado 25  $\mu\text{L}$  de solução 55 mM de IAA em 25 mM de bicarbonato de amônio para serem alquiladas, também por 45 min no escuro à temperatura ambiente. Posteriormente, o líquido excedente foi removido e os fragmentos lavados com bicarbonato de amônio a 50 mM e acetonitrila 50 mM. O material foi lavado com água MilliQ e o sobrenadante foi descartado. Depois, os fragmentos foram novamente desidratados com acetonitrila 100% por três vezes. Finalizadas estas etapas, as amostras foram secas em Speed vac até secar o gel.

Os fragmentos foram reidratados com 10 a 15  $\mu\text{L}$  de solução contendo tripsina na concentração de 20  $\text{ng}/\mu\text{L}^{-1}$ . Após 10 minutos foi adicionado  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  até cobrir o gel. O material incubado a 37 °C overnight (16 h), garantindo máxima tripsinização da proteína. Em seguida, após um spin, o excesso de tripsina foi removido e transferido para um novo tubo. Ao fragmento foi adicionada a solução de extração 5% de ácido trifluoroacético (TFA) em solução com 50% de acetonitrila, após 40 min em banho de gelo, a solução foi retirada e adicionada à solução remanescente de tripsina. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. Por fim, as amostras foram totalmente evaporadas, utilizando evaporadores centrífugos tipo Speed-Vac (Eppendorf) e armazenadas a -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro Autoflex III MALDItoF/ToF (Bruker Daltonics) disponibilizado pela Central Analítica do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, CETENE, usando matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma/C8982) e conforme os protocolos de análise padronizados de: tipagem por massa de peptídeos (PMF - peptide mass fingerprinting; método refletido positivo RP\_Proteomics\_HPC). Os íons foram acelerados a 19 kV, laser Nd:YAG smartbeam 355 nm, 100 Hz.

### 2.2.6 Identificação presumível das proteínas

Os espectros foram identificados através da análise dos arquivos peaklist.xml no software Mascot (Matrix Inc.) pelo método de PMF contra o banco de dados de plantas utilizando espécies filogeneticamente próximas ou aquelas como maiores quantidades de dados disponíveis. Utilizou-se a seguinte ordem de prioridade: *Saccharum*, *Sorghum*, *Triticum*, *Poales*, Viridiplantae, Other green plants, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, Proteobacteria e Other Proteobacteria disponíveis no banco de dados de proteínas de cana da UNICAMP (<http://dalton-server.iqm.unicamp.br/mascot/>) utilizando-se os seguintes parâmetros (1) base de dados: Uniprot *Saccharum*, Uniprot *Sorghum*, Uniprot *Triticum*, Uniprot *Poales*, Swissprot e NCBI; (2) taxonomia: Viridiplantae; (3) modificação fixa: carbamidometil (C); (4) modificação variável: oxidação (M); e (5) tolerância: De 1.2 a 0.1 Da; 100 e 150 ppm.

Foram consideradas significativas as identificações com score maior que o valor limite (E-value). O score equivale a  $-10 \cdot \log(P)$ , sendo P a probabilidade de similaridade encontrada ser ao acaso. Valores de score acima do valor limite têm significância estatística ( $p < 0,05$ ). Os acessos significativamente identificados foram submetidos à busca na ferramenta Retrieve ID na base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>), para detalhes dos descritores das proteínas anotadas.

### 2.2.7 Ontologia gênica (GO)

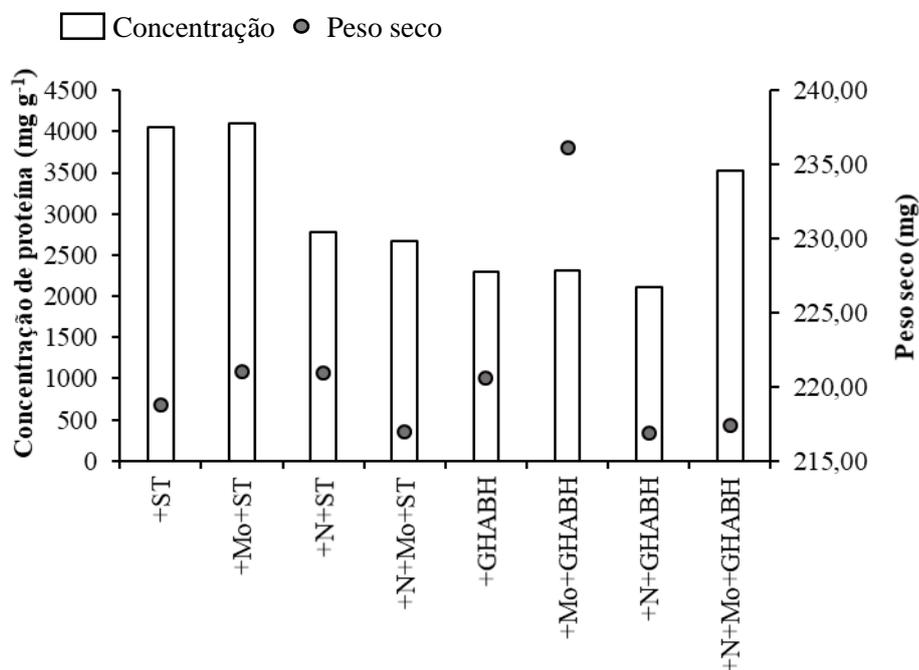
As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta *Retrieve ID* e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico, componente celular e função molecular com o programa *Biobam Bioinformatics Solutions – Blast2Go* (<https://www.biobam.com/omicsbox/>). A distribuição de termos GO ou categorias funcionais do conjunto de DEPs de cada tratamento foi utilizada na comparação entre a aplicação ou não de Mo.

### 3 RESULTADOS

Os valores médios de concentração de proteínas solúveis total na folha +1 de cana-de-açúcar da variedade RB867515 variaram de 2105,14 a 4098,05  $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca foliar (Figura 05). Para todas as amostras, a folha +1 apresentou alta quantidade de proteína solúvel total, exceto para a amostra com Mo e o conjunto de bactérias GHABH, que apresentou baixa quantidade de proteínas solúvel para a folha.

Para a bactéria ST, a amostra que apresentou maior conteúdo de proteínas totais foi a amostra da bactéria com o micronutriente. Neste contexto, houve incremento das proteínas com a aplicação do adubo Mo, mas em conjunto com o N e a ST o número total de proteínas foi reduzido.

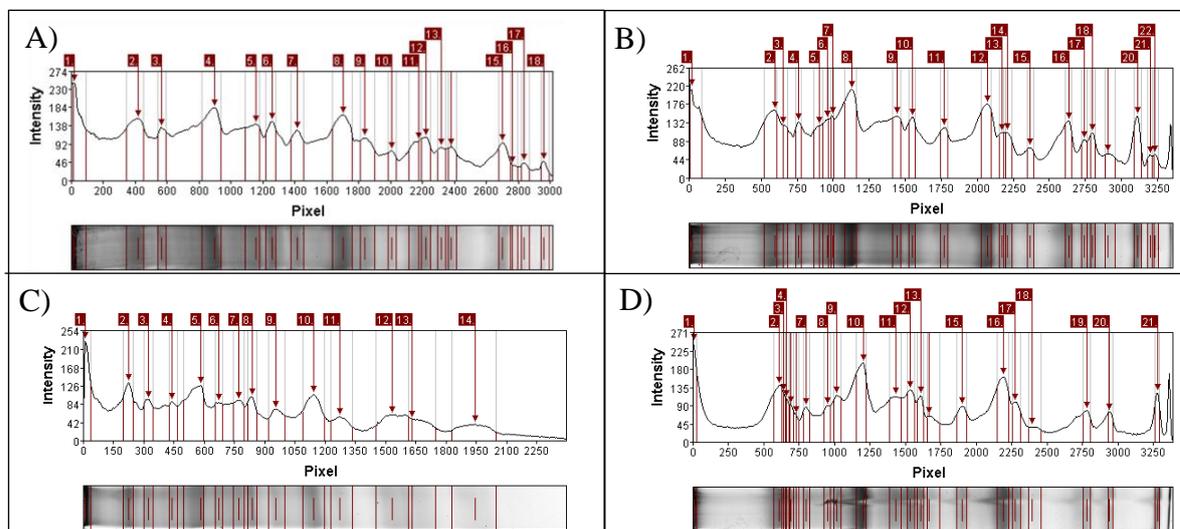
Para o conjunto de bactérias GHABH a amostra que apresentou maior número de proteínas solúveis totais foi o conjunto de N, Mo e inoculante com 3520,33  $\mu\text{g g}^{-1}$ . A aplicação do micronutriente incrementou o total de proteínas em todas as situações, independente da interação com o N-fertilizante.



**Figura 05.** Concentração de proteínas solúveis total e peso seco da folha +1 da cana-de-açúcar da variedade RB867515 aos 100 dias após a germinação. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp.; GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*). (Fonte: Elaborada pela autora)

Na análise dos perfis dos géis SDS-PAGE pelo software Gel Analyzer, observamos que, de modo geral, os tratamentos inoculados com a bactéria ST e aplicado Mo (Figura 06 A e B)

apresentaram menores quantidades de bandas que os mesmos tratamentos com N (Figura 06 C e D). Da mesma forma, os tratamentos com a bactéria GHABH e Mo (Figura 06 A e B) demonstrou maior quantidade de bandas quando aplicado o N (Figura 06 C e D).



**Figura 06.** Bandas do gel SDS-PAGE da cana-de-açúcar da variedade de cana-de-açúcar RB867515, analisadas pelo software Gel Analyzer nos géis (A) Molibdênio + *Stenotrophomonas* sp. (B) Nitrogênio, + Molibdênio + *Stenotrophomonas* sp. (C) Molibdênio + GHABH (G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*) (D) Nitrogênio + Molibdênio + GHABH. Numerações e pesos moleculares foram utilizados para identificar bandas equivalentes. (Fonte: Elaborada pela autora).

Foram obtidos quatro géis SDS-PAGE das comparações dos tratamentos escolhidos para a variedade de cana-de-açúcar RB867515 inoculada e com aplicação ou não de Mo (Figura 07 e 09) e aplicação ou não de N e Mo (Figura 08 e 10). Na análise estatística do perfil eletroforético para cada gel, de acordo com o teste de Tukey, foi constatado diferenças significativas entre as bandas dos tratamentos (Tabela 05 e 06).

O gel SDS-PAGE revelou que o perfil eletroforético é diferente entre as amostras com e sem Mo, mas que de modo geral, a distribuição das bandas foi semelhante entre os tratamentos (Figura 07, 08, 09 e 10).

O protocolo de extração para proteínas foliares possibilitou recuperar e solubilizar alta quantidade de proteínas em todas as amostras analisadas (Figura 06, 07, 08 e 09). No total, ocorreram 8; 10; 10 e 8 bandas proteicas significativamente diferentes, respectivamente para as comparações A, B, C e D (Tabela 05 e 06).

Para a comparação A houve incremento na intensidade das bandas com a aplicação do Mo apenas para as bandas número 9 (Tabela 05 – Comparação A). Em contraste, houve redução das intensidades para as bandas 4; 11; 13 e 15 na mesma comparação. Ainda, surgiram duas bandas exclusivas com a inoculação de ST e aplicação do Mo e uma banda exclusiva para a inoculação de ST.

Com a introdução do N no sistema ocorreram poucas diferenças significativas entre as amostras (Tabela 05 - Comparação B). Para todas as bandas em que houveram diferenças significativas houve incremento na intensidade das bandas, exceto para a única banda exclusiva que ocorreu para o tratamento com N e ST.

Esse mesmo resultado ocorreu para a comparação C em que não houve aplicação de N para os tratamentos (Tabela 06 – Comparação C). Para estas amostras, ocorreram duas bandas exclusivas apenas com a inoculação de GHABH e uma banda exclusiva com a inoculação de GHABH e aplicação de Mo.

Para os tratamentos inoculados com GHABH e com aplicação de N e inoculados com GHABH e aplicação de Mo e N ocorreram redução das intensidades para todas as amostras (Tabela 06 – Comparação D). Da mesma forma, só ocorreram bandas exclusivas com a aplicação do micronutriente Mo na planta.

**Tabela 05.** Tabela resumo de análise de variância para intensidade das bandas do perfil eletroforético de extração de proteínas solúveis totais em SDS-PAGE de cana-de-açúcar da variedade RB867515 com e sem aplicação de molibdênio e nitrogênio e com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 dias após a germinação. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo.

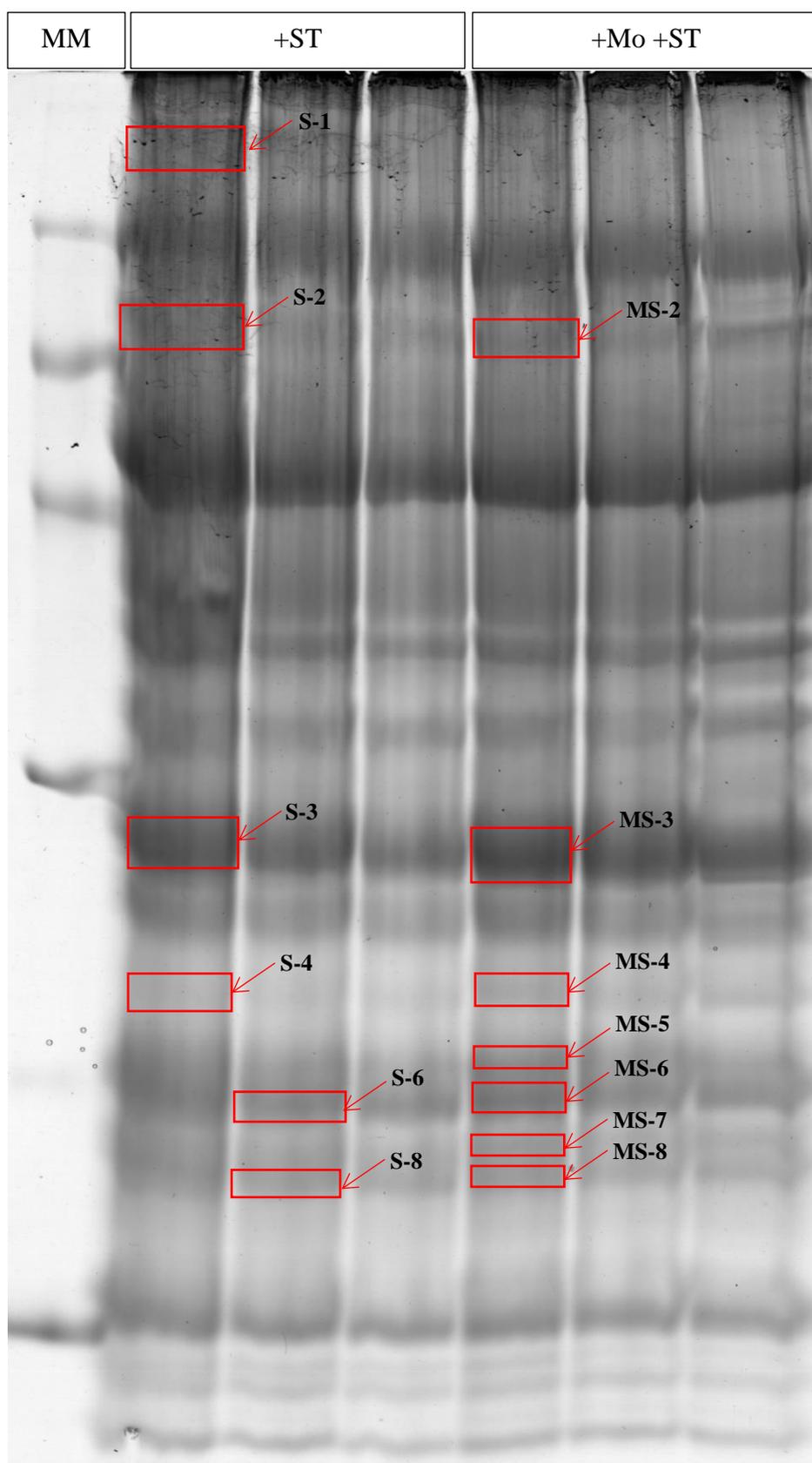
Banda	Comparação A			Nomenclatura		Banda	Comparação B			Nomenclatura	
	+ST	+Mo +ST	F > P	+ST	+Mo +ST		+N +ST	+N +Mo +ST	F > P	+N +ST	+N +Mo +ST
1	14617,7	14945,7	0,08 <sup>ns</sup>	-	-	1	6705,3	5880,3	0,94 <sup>ns</sup>	-	-
2	13138,3	0,0	180,24*	S-1	-	2	6834,7	11083,7	17,14**	S-9	MS-9
3	15881,3	17589,0	5,24 <sup>ns</sup>	-	-	3	4563,7	6305,7	3,33 <sup>ns</sup>	-	-
4	11076,3	9022,3	46,06**	S-2	MS-2	4	3650,0	4436,3	5,82 <sup>ns</sup>	-	-
5	23253,0	19761,7	0,94 <sup>ns</sup>	-	-	5	11631,0	18262,0	15,06 <sup>ns</sup>	-	-
6	12229,7	14841,7	2,67 <sup>ns</sup>	-	-	6	4892,7	6781,0	3,38 <sup>ns</sup>	-	-
7	9446,0	9533,3	0,01 <sup>ns</sup>	-	-	7	5372,7	0,0	45,34**	S-10	-
8	11140,7	10443,7	0,23 <sup>ns</sup>	-	-	8	5297,3	6127,0	0,61 <sup>ns</sup>	-	-
9	16046,3	20278,0	86,15**	S-3	MS-3	9	6034,7	7680,0	7,93 <sup>ns</sup>	-	-
10	10859,0	10638,3	0,16 <sup>ns</sup>	-	-	10	10368,3	13566,3	49,04**	S-11	MS-11
11	5301,7	5197,3	624,01*	S-4	MS-4	11	5053,7	7803,7	8,66 <sup>ns</sup>	-	-
12	0,0	6851,7	106,11*	-	MS-5	12	8870,0	12713,7	7,59 <sup>ns</sup>	-	-
13	11979,3	8090,3	21,18*	S-6	MS-6	13	4971,3	6887,7	4,66 <sup>ns</sup>	-	-
14	0,0	4224,3	1667,69*	-	MS-7	14	6782,3	8646,3	1,36 <sup>ns</sup>	-	-
15	10619,7	5070,3	29,47*	S-8	MS-8	15	-	-	-	-	-
16	8571,3	7033,3	6,97 <sup>ns</sup>	-	-	16	-	-	-	-	-
17	1840,0	1595,3	1,59 <sup>ns</sup>	-	-	17	-	-	-	-	-
18	2250,7	2305,0	0,1 <sup>ns</sup>	-	-	18	-	-	-	-	-
19	2630,3	2587,3	0,03 <sup>ns</sup>	-	-	19	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

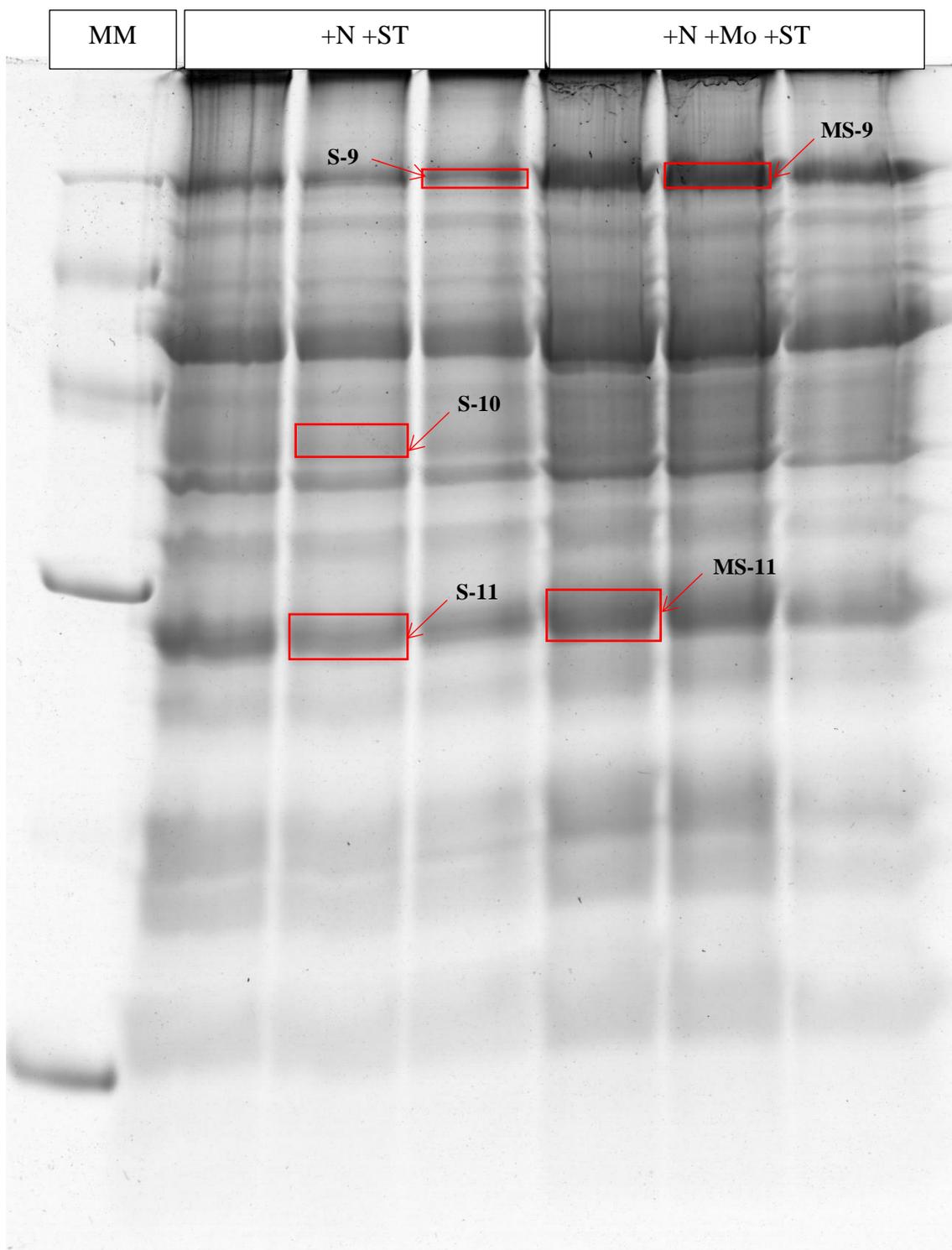
**Tabela 06.** Tabela resumo de análise de variância para intensidade das bandas do perfil eletroforético de extração de proteínas solúveis totais em SDS-PAGE de cana-de-açúcar da variedade RB867515 com e sem aplicação de molibdênio e nitrogênio e com e sem inoculação de bactérias promotoras de crescimento aos 100 dias após a germinação. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*). Nomenclatura G refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo.

Comparação C				Nomenclatura		Comparação D				Nomenclatura	
Banda	+GHABH	+Mo +GHABH	F > P	+GHABH	+Mo +GHABH	Banda	+N +GHABH	+N +Mo +GHABH	F > P	+N +GHABH	+N +Mo +GHABH
1	14259,0	13473,7	0,56 <sup>ns</sup>	-	-	1	10504,3	6013,3	5,44 <sup>ns</sup>	-	-
2	12422,3	12026,7	0,21 <sup>ns</sup>	-	-	2	13994,0	7825,0	10,27 <sup>ns</sup>	-	-
3	4693,0	5311,3	0,6 <sup>ns</sup>	-	-	3	0,0	1235,7	29,56 <sup>**</sup>	-	MG-10
4	4945,3	3626,0	5,3 <sup>ns</sup>	-	-	4	0,0	1295,3	23,77 <sup>**</sup>	-	MG-11
5	0,0	4358,0	840,13 <sup>*</sup>	-	MG-1	5	0,0	1724,7	41,33 <sup>**</sup>	-	MG-12
6	4867,0	11338,7	27,59 <sup>**</sup>	G-2	MG-2	6	4015,0	1044,3	33,51 <sup>**</sup>	G-13	MG-13
7	3528,0	0,0	137,19 <sup>*</sup>	G-3	-	7	4858,3	3408,3	5,59 <sup>ns</sup>	-	-
8	4875,0	5291,0	17,5 <sup>**</sup>	G-4	-	8	0,0	3597,7	485,6 <sup>*</sup>	-	MG-14
9	15653,7	17169,7	0,34 <sup>ns</sup>	-	-	9	10096,0	4845,3	14,28 <sup>ns</sup>	-	-
10	8778,3	11458,3	3,72 <sup>ns</sup>	-	-	10	18687,0	12603,3	30,99 <sup>**</sup>	G-15	MG-15
11	5653,3	7366,3	28,93 <sup>**</sup>	G-5	MG-5	11	8301,7	7929,0	0,02 <sup>ns</sup>	-	-
12	5660,0	6457,0	4,84 <sup>ns</sup>	-	-	12	7022,3	5349,7	0,99 <sup>ns</sup>	-	-
13	11905,0	17787,0	12,52 <sup>ns</sup>	-	-	13	5337,7	4350,3	6,25 <sup>ns</sup>	-	-
14	3366,7	4988,0	67,85 <sup>**</sup>	G-6	MG-6	14	4511,0	4161,7	0,11 <sup>ns</sup>	-	-
15	4765,3	5414,0	0,32 <sup>ns</sup>	-	-	15	7002,7	4813,0	3,39 <sup>ns</sup>	-	-
16	3029,7	4267,3	6,44 <sup>ns</sup>	-	-	16	14833,0	10943,7	2,08 <sup>ns</sup>	-	-
17	5575,3	6788,3	60,27 <sup>**</sup>	-	-	17	7065,7	4278,0	69,02 <sup>**</sup>	G-16	MG-16
18	3050,3	4130,3	6,97 <sup>ns</sup>	-	-	18	3834,0	2632,7	1,79 <sup>ns</sup>	-	-
19	3326,3	5062,3	41,15 <sup>**</sup>	G-7	MG-7	19	5216,0	3775,0	4,88 <sup>ns</sup>	-	-
20	3671,7	5285,7	44,34 <sup>**</sup>	G-8	MG-8	20	5943,3	2279,3	393,26 <sup>*</sup>	G-17	MG-17
21	6135,7	9265,0	20,0 <sup>**</sup>	G-9	MG-9	21	6177,0	3112,0	10,6 <sup>ns</sup>	-	-
22	1452,0	2017,7	2,81 <sup>ns</sup>	-	-	22	-	-	-	-	-
23	1695,0	1926,0	0,23 <sup>ns</sup>	-	-	23	-	-	-	-	-

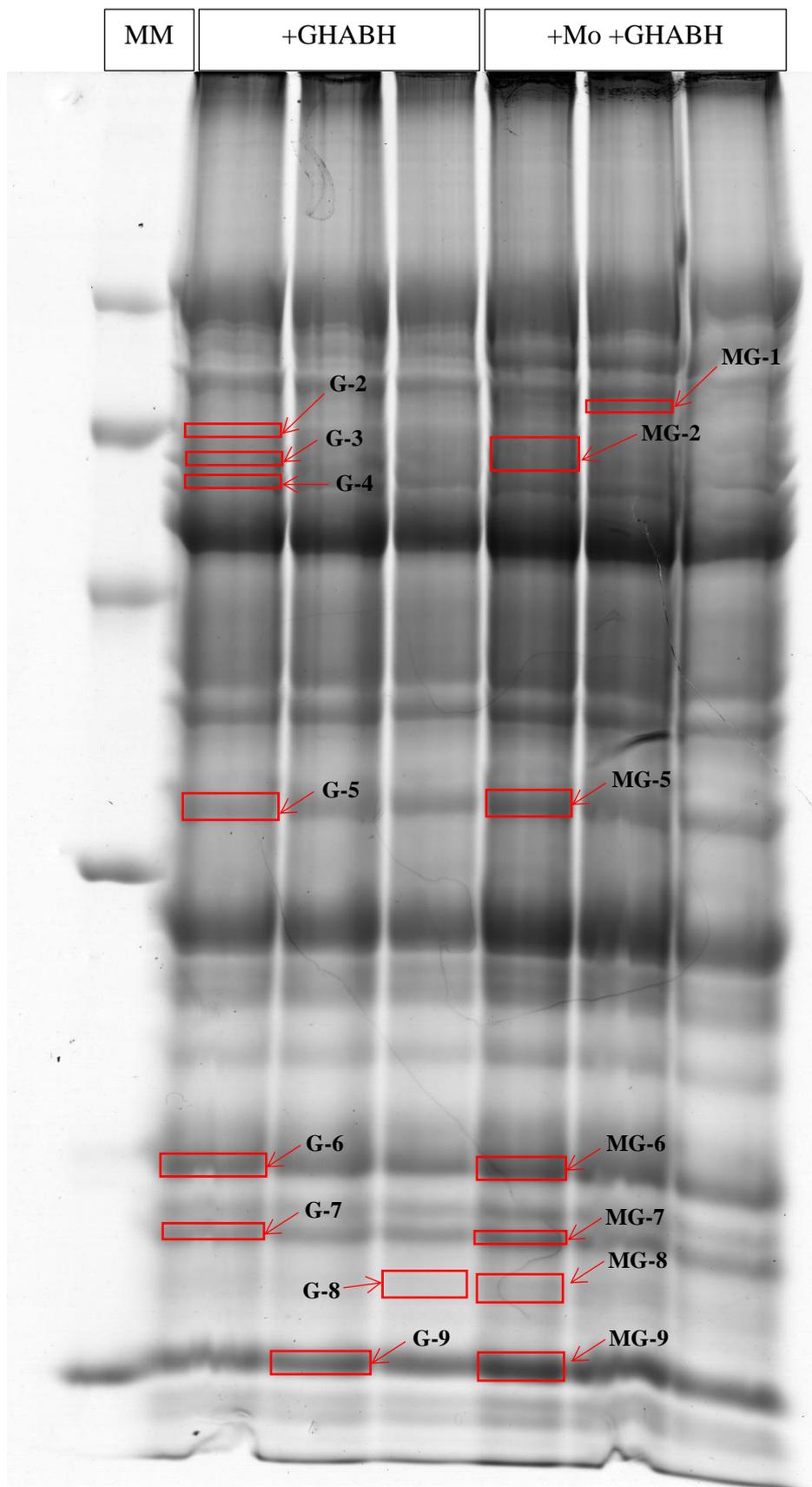
Fonte: Elaborada pela autora.



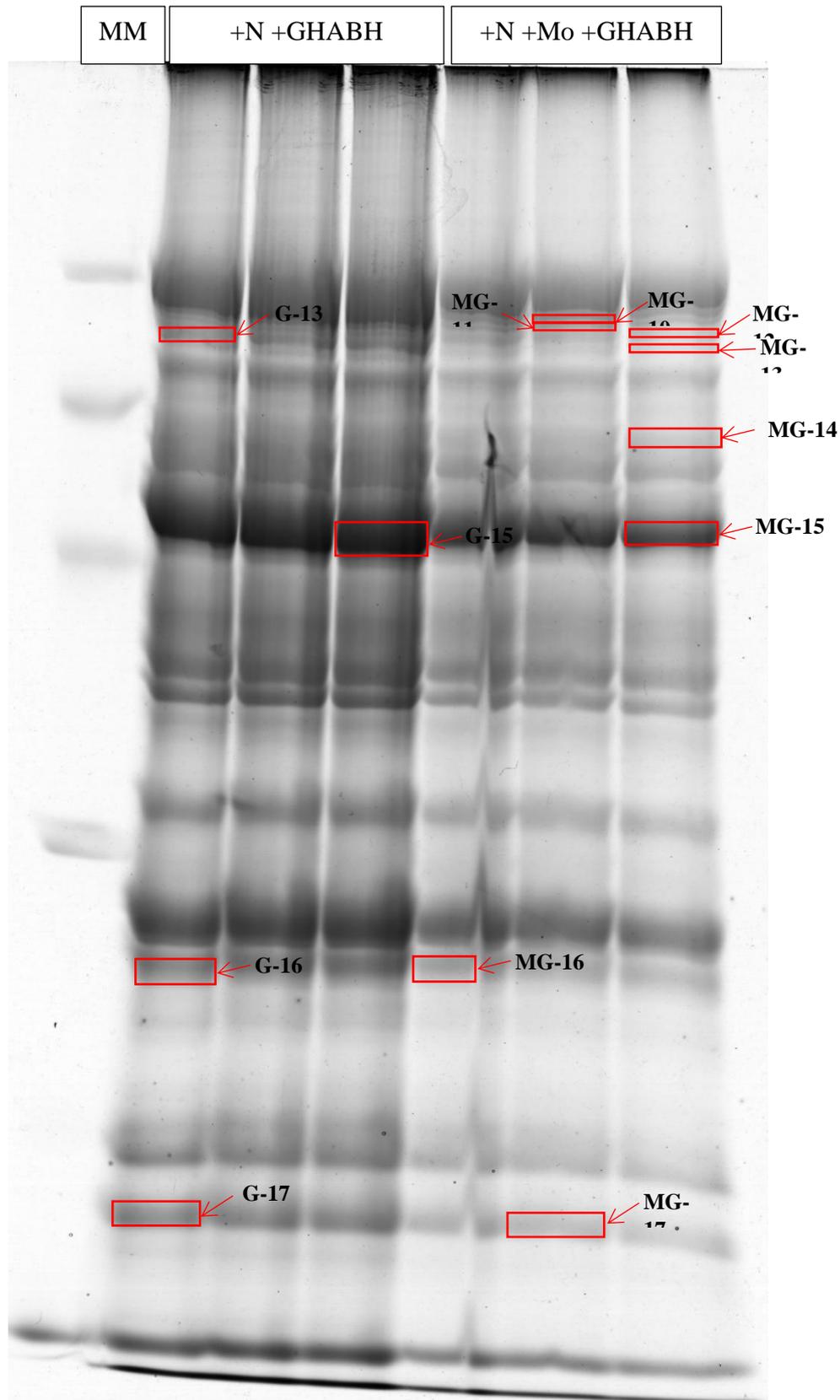
**Figura 07.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 01). MM: Marcador Molecular; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MS na associação entre inoculação e aplicação de Mo. (Fonte: Elaborada pela autora).



**Figura 08.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 02). MM: Marcador Molecular; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MS na associação entre inoculação e aplicação de Mo. (Fonte: Elaborada pela autora).



**Figura 09.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 03). MM: Marcador Molecular; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Nomenclatura G refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo. (Fonte: Elaborada pela autora).



**Figura 10.** Perfil Localização dos fragmentos excisados do gel SDS-PAGE (1D) de folha +1 da variedade RB867515 de cana planta com e sem a aplicação de molibdênio e inoculadas com bactérias promotoras de crescimento para análise no espectrômetro de massas (Comparação 04). MM: Marcador Molecular; N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropidicaceae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. Nomenclatura G refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo. (Fonte: Elaborada pela autora).

As bandas selecionadas e excisadas a partir da análise comparativa do gel SDS-PAGE foram analisadas em espectrometria de massas para sua identificação presumível em bancos de dados de acesso público e fechado através da análise dos arquivos *peaklist.xml*. A identificação das proteínas selecionadas como diferenciais é apresentada nas tabelas 07 e 08.

Na análise realizada em espectrômetro para as bandas 39,13% proteínas digeridas com tripsina não resultaram em espectros de massa com qualidade necessária para análise no programa Mascot. Destas, cinco proteínas foram para as amostras com inoculação de ST; uma para inoculação de ST e aplicação de Mo; oito para as amostras com inoculação de GHABH e aplicação de Mo; e cinco para inoculação de GHABH e aplicação de N e Mo (Tabela 07 e 08).

Com base nas tabelas de identificação, as proteínas foram presumivelmente 47,83% das amostras foram discriminadas em organismos de *Saccharum* sp. ou de outras plantas da família Poaceae. Para as proteobactérias foram diferenciadas 4,35% das amostras, uma vez que as bactérias utilizadas para inoculação na cana-de-açúcar pertencem ao filo e são capazes de colonizar tecidos da parte aérea da cultura. Apenas 4,35% das amostras foram identificadas em bancos de *Arabidopsis thaliana*, de acordo com a maior similaridade estatística obtida com o programa Mascot.

Para os géis da comparação A e B (Figura 07 e 08), os resultados obtidos na identificação das proteínas estão apresentados na Tabela 06.

Na comparação A, quando os tratamentos foram inoculados com a bactéria ST foi observada a identificação de seis proteínas selecionadas como diferenciais. De modo geral, as proteínas atuam na biossíntese e assimilação de N (S-2: C4 fosfoenolpiruvato carboxilase ativo), divisão celular (S-6: Cinesina KIN-7D), desenvolvimento da planta (S-4: Fator de splicing rico em arginina/serina) e proteínas ligadas ao estresse na planta (S-4: Fator de splicing rico em arginina/serina e S-8: Proteína potenciadora que evoluiu com oxigênio 3-2) (Tabela 07).

Nos tratamentos em que houveram a aplicação do adubo molíbdico associado à inoculação de ST foram identificadas três proteínas diferenciais que, de modo geral, atuam em resposta à síntese e transporte de auxinas e ácido abscísico (MS-2: Proteína não caracterizada – Domínio de ligação ao DNA; MS-8: Membro da família do transportador ABC B19) e armazenamento de fotossintatos e crescimento (MS-3: Invertase ativa da parede celular).

Na comparação B a introdução de nitrogênio no sistema com inoculante modificou o sistema de acúmulo de proteínas na planta. Contudo, a proteína de fator de splicing rico em arginina/serina continuou a ser acumulada, independentemente da aplicação de N (S-9). Também foram encontradas proteínas que desempenham papéis críticos em regulação do desenvolvimento (S-10: Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA); S-10: Homólogo

de DNA polimerase direcionado a RNA) da planta, além de uma proteína de bactéria (MS-9: Sulfite redutase). Uma proteína não foi caracterizada, mas apresenta função de transferência mitocondrial (S-11: Proteína não caracterizada).

**Tabela 07.** Identificação presumível das bandas de gel SDS-PAGE de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 submetidas a inoculação com a bactérias *Stenotrophomonas* sp. e aplicação do adubo molíbdico e nitrogenado. A - Inoculação versus inoculação com Mo; B – N e inoculação versus inoculação, Mo e N; S- sem Mo, MS- com Mo. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MS na associação entre inoculação e aplicação de Mo.

BANDA	ANOTAÇÃO PRESUMÍVEL	ACESSO UNIPROT	E-VALUE	PROCESSO BIOLÓGICO	SCORE	COBERTURA %	ESPÉCIE ORTÓLOGA	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
S-1	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
S-2	C4 fosfoenolpiruvato carboxilase ativo	Q8H1X3	0,00011	Ciclo do ácido tricarbóxico	76	27	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	Não encontrado
MS-2	Proteína não caracterizada (Domínio de ligação ao DNA)	A0A3B6 PKH6	0,0043	Não encontrado	58	47	<i>Triticum aestivum</i>	Não encontrado
S-3	Alfa-amilase endógena / inibidor de subtilisina	P16347	0,029	Não encontrado	54	61	<i>Triticum aestivum</i>	Não encontrado
MS-3	Invertase ativa da parede celular	M1TJ91	0,017	Processo metabólico de carboidrato	49	33	<i>Saccharum hybrid cultivar FN-41</i>	Não encontrado
S-4	Fator de splicing rico em arginina/serina	A0A059 Q2G6	0,044	Ligação de RNA via spliceossoma	51	28	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	Complexo Spliceossoma
MS-4	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MS-5	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
S-6	Proteína semelhante à cinesina KIN-7D cloroplástica	Q6YZ52	0,016	Movimento baseado em microtúbulos; Atividade motora de microtúbulo	55	12	<i>Oryza sativa</i> subsp. Japonica	Não encontrado
MS-6	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MS-7	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-

(Continua)

**Tabela 08.** Identificação presumível das bandas de gel SDS-PAGE de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 submetidas a inoculação com a bactérias *Stenotrophomonas* sp. e aplicação do adubo molíbdico e nitrogenado. A - Inoculação versus inoculação com Mo; B – N e inoculação versus inoculação, Mo e N; S- sem Mo, MS- com Mo. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MS na associação entre inoculação e aplicação de Mo

								(Conclusão)
S-8	Proteína potenciadora que evolui com oxigênio 3-2, cloroplástica	Q41932	0,019	Fotossíntese	59	26	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Fotossistema II; complexo evolutivo de oxigênio; componente de membrana extrínseco
MS-8	Membro da família do transportador ABC B19	A0A1D6 EFF7	0,039	Transporte transmembrana	71	17	<i>Zea mays</i>	Componente integral da membrana
COMPARAÇÃO B								
S-9	Fator de splicing rico em serina/arginina RSZ21	Q6K4N0	0,041	Ligação de RNA via spliceossoma	51	50	<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	Complexo spliceossoma
MS-9	Componente beta da hemoproteína sulfito redutase [NADPH]	B7JAM6	0,049	Processo biosintético; Processo celular	66	29	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	Complexo sulfito redutase (NADPH)
S10	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	0,039	Termos não encontrados	57	52	<i>Oenothera berteriana</i>	Termos não encontrados
S-11	Proteína não caracterizada	A0A0A9 S8S8	0,012	Peptídeo de transferência mitocondrial	76	100	<i>Arundo donax</i> (Giant reed)	Termos não encontrados
MS-11	Proteína não caracterizada (Domínio de Segregação cromossômica ATPase)	A0A1D6 NOM1	0,024	Termos não encontrados	73	19	<i>Zea mays</i>	Termos não encontrados

Fonte: Elaborada pela autora.

Para os géis da comparação C e D (Figura 09 e 10), os resultados obtidos na identificação das proteínas estão apresentados na tabela 08.

Na comparação C, quando os tratamentos foram inoculados com a bactéria GHABH foi observada a identificação de três proteínas diferenciais que, de modo geral, atuam na biossíntese do DNA (G-4: Proteína bifuncional de síntese de folato). Além disso, uma proteína foi identificada no banco de proteobactéria e está relacionada a síntese de RNA (G-6: RNA helicase RhlB dependente de ATP).

Com a aplicação conjunta do Mo com as bactérias GHABH foram identificadas cinco proteínas diferenciais que, de forma geral, atuam na fotossíntese (Fotossistema I) (MG-1: 2-fetil-1,4-beta-naftoquinona metiltransferase); regulação de tolerância/acumulação de metal pesado (MG-2: Proteína 1 semelhante à metalotioneína); Transporte de fagossomos do citoplasma para o vacúolo (MG-6: Proteína semelhante à ubiquitina ATG12); regulação no crescimento e desenvolvimento da planta (MG-8: Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA). Neste tratamento, uma proteína não foi caracterizada (MG-9), mas é um Peptídeo de transferência do cloroplasto.

Para a comparação D ocorreram onze proteínas diferenciais, no qual apenas seis foram identificadas (Tabela 08). Das bandas que apresentaram diferenças significativas para associação entre bactéria e GHABH e o N apenas uma proteína foi caracterizada, no qual é relacionada à regulação de transcrição, tradução e replicação do DNA (G-16: mTERF). Com a inoculação de GHABH e aplicação de Mo e N foram acumuladas proteínas ligadas a processos de regulação de proteínas (MG-10: Histona H1.2), processo metabólico lipídico (MG-11: Proteína transportadora acila 2, precursora de cloroplasto, putativa, expressa) desenvolvimento em plantas (MG-13: Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA), fotossíntese (MG-14: Cadeia grande de bifosfato carboxilase de ribulose), antioxidação (MG-16: Isozima da catalase 3).

**Tabela 09.** Identificação presumível das bandas de gel SDS-PAGE de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 submetidas a inoculação com a bactérias GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e aplicação do adubo molíbdico. A - Inoculação versus inoculação com aplicação de Mo; B – N e inoculação versus inoculação, Mo e N; S- sem Mo, MS- com Mo. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo.

BANDA	ANOTAÇÃO PRESUMÍVEL	ACESSOU UNIPROT	E-VALUE	PROCESSO BIOLÓGICO	SCORE	COBERTURA %	ESPÉCIE ORTÓLOGA	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR
<b>COMPARAÇÃO C</b>								
MG-1	2-fitil-1,4-beta-naftoquinona metiltransferase cloroplástica	T1MZM1	0,051	Processo biossintético/Processo celular	66	30	Triticum urartu	Cloroplasto
G-2	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MG-2	Proteína semelhante à metalotioneína	P20238	0,042	-	60	-	Erythranthe guttata	-
G-3	Não identificado	-	-	-	-	59	-	-
G-4	Proteína bifuncional de síntese de folato	Q1ENB6	0,027	Processo biossintético/Processo celular/Atividade da transferase	62	29	Arabidopsis thaliana	-
MG-4	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
G-5	6.1, formiltetra-hidrofolato deformilase 1, isoforma do tipo mitocondrial X2	UPI0006 AB1A0B	0,028	Termos não encontrados	85	27	Brassica napus	Termos não encontrados
MG-5	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
G-6	RNA helicase RhlB dependente de ATP	A7MQI2	0,007	-	74	32	Cronobacter sakazakii	-
MG-6	Proteína semelhante à ubiquitina ATG12	A2YAG8	0,015	Processo catabólico/Organização do componente celular	55	44	Oryza sativa subsp. indica	Citoplasma
G-7	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MG-7	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
G-8	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MG-8	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	0,051	-	56	53	Oenothera berteriana	Mitocondria
G-9	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-

(Continua)

**Tabela 010.** Identificação presumível das bandas de gel SDS-PAGE de folhas de cana-de-açúcar da variedade RB867515 submetidas a inoculação com a bactérias GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans* e aplicação do adubo molíbdico. A - Inoculação versus inoculação com aplicação de Mo; B – N e inoculação versus inoculação, Mo e N; S- sem Mo, MS- com Mo. Nomenclatura S refere-se a fragmentos excisados do gel SDS-PAGE apenas com inoculação enquanto que MG na associação entre inoculação e aplicação de Mo.

								(Conclusão)
MG-9	Proteína não caracterizada (Peptídeo de transferência de cloroplasto)	A0A0A1 I606	0,038	Termos não encontrados	50	32	Saccharum hybrid cultivar R570	Termos não encontrados
COMPARAÇÃO D								
MG-10	Histone H1.2	P26569	0,033	Organização do componente celular	57	47	Arabidopsis thaliana	Núcleo da célula hospedeira
MG-11	Proteína transportadora acila 2, precursora de cloroplasto, putativa, expressa	Q2R3H7	0,045	Processo metabólico lipídico/Processo biosintético/processo celular	66	39	Oryza sativa subsp. Japonica	
MG-12	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
G-13	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MG-13	Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA	P31843	0,028	Termos não encontrados	62	52	Oenothera berteriana	Termos não encontrados
G-14	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MG-14	Cadeia grande de bifosfato carboxilase de ribulose	A0A1C9 HG67	0,0059	Processo metabólico	58	25	Saccharum spontaneum	
G-15	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-
MG-15	Isoenzima da catalase	P18123	0,04	Resposta ao estresse	57	22	Zea mays	
G-16	Proteína não caracterizada (mTERF)	A0A1E5 UI25	0,033	Componente do processo metabólico contendo nucleobase/Processo biossintético	72	33	Dichanthe lig osanthes	
MG-16	Não identificado	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4 DISCUSSÕES

O molibdênio (Mo) é um micronutriente aniônico que participa de um composto pterina em enzimas que são dependentes da componente Moco (BITTNER, 2014), e que por isso, apresentam o micronutriente no centro ativo da enzima com a função de transportar elétrons durante às reações bioquímicas (MENDEL; LEIMKUHNER, 2015).

Até momento, mais de cinquenta enzimas dependentes de Mo foram identificadas, contudo em sua grande maioria, estas são encontradas em bactérias (IOBBI-NIVOL et al., 2013). Dentre estas, uma importante enzima, a nitrogenase, é presente em bactérias diazotróficas que catalisam a conversão de N atmosférico em amônia (NH<sub>3</sub>) no processo da FBN (KEUTER; VELDKAMP; CORRE, 2014; STÜEKEN et al, 2015), principal processo de entrada de N nos ecossistemas.

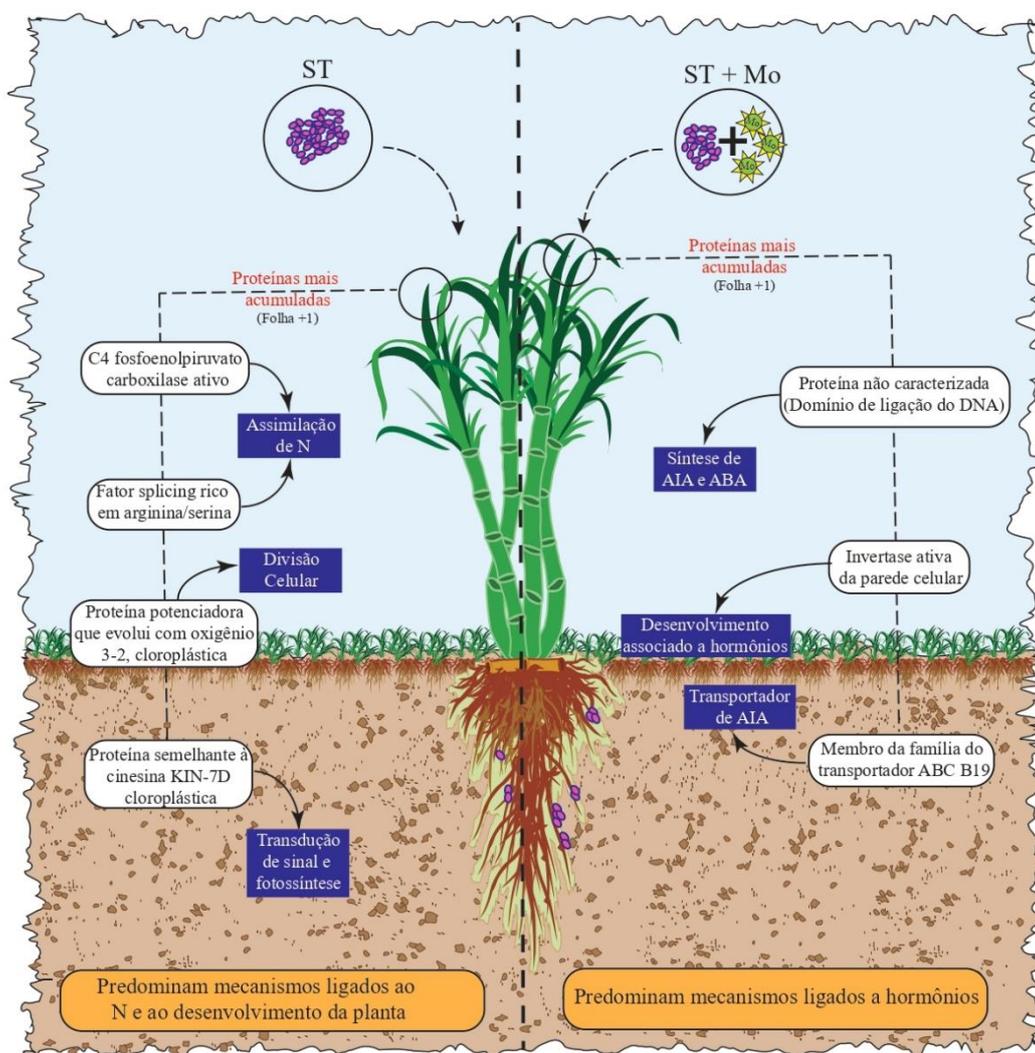
Já em eucariotos, apenas sete enzimas são identificadas (HILLE, NISHINO; BITTNER, 2011), no qual cinco destas foram em plantas: A redutase do nitrato, que atua no ciclo do N, e outras quatro importantes molibdoenzimas como a xantina oxidase/desidrogenase (XDH), a sulfito oxidase (SO), a amidoxima redutase (mARC) e a aldeído oxidase (AO) com funções envolvidas no catabolismo de purina, no metabolismo do enxofre (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>); na catálise redutiva de compostos hidroxilados e na síntese de hormônios do ABA e AIA (TEJADA-JIMENEZ et al., 2013; TEJADA-JIMENEZ et al., 2017; TEJADA-JIMENEZ et al., 2018).

Por este motivo, o Mo é apontado como um importante contribuidor do crescimento e desenvolvimento vegetal, uma vez que sua introdução no sistema planta pode auxiliar na atividade dessas enzimas atuantes em diferentes processos de crescimento e desenvolvimento, principalmente quando associado à BPCP.

Em nossa pesquisa, quando foi realizada apenas a inoculação de ST foram acumuladas proteínas ligadas à biossíntese e assimilação de N (S-2), transdução de sinal (S-6), proteínas ligadas ao desenvolvimento da planta (S-4) e divisão celular e estresse; S-8) (Tabela 07; Figura 11).

Algumas dessas estão relacionadas ao processo de absorção de N, como a PEP carboxilase que é a principal enzima ligada à processos de fotossíntese em plantas C4 e CAM (CACEFO et al., 2019), mas que quando envolvida no ciclo do ácido tricarboxílico apresenta um papel de suporte no metabolismo de absorção de N na geração de energia para o processo, uma vez que a fotorrespiração está intimamente ligada a atividade do glutamato e elevação dos níveis de serina e glicina (STITT et al., 1999; FOYER; FERRARIO-MÉRY; NOCTOR, 2001; STITT et al., 2002; O'LEARY; PARK; PLAXTON, 2011), fato evidenciado pelo alto acúmulo

da proteína S-4, necessária para interações proteína-proteína e por regular processos (GRAVELEY; MANIATIS, 1998; ZHANG et al., 2017).



**Figura 11.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) inoculação de ST (B) aplicação de Mo e inoculação de ST (Comparação A). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas azuis funções das proteínas na planta. ST: *Stenotrophomonas* sp.; Mo: Molibdênio. (Fonte: Elaborada pela autora).

As cinesinas (S-6) estão relacionadas com a transdução de sinal na interação entre a cana-de-açúcar e inoculante (CARMONA et al., 2004). Como mostra Lin et al. (2013) que com o objetivo de analisar os perfis fisiológicos da cana-de-açúcar, relacionou as cinesinas à utilização de rizodeposição de bactérias rizosféricas e apresentou a proteína como modelo para rota metabólica de interação planta inoculante.

Algumas proteínas ligadas ao estresse e divisão celular também foram identificadas (S-8). Na cultura da cana-de-açúcar a falta do restringe em 92% o acúmulo de matéria seca, 91%

o crescimento da planta e em 83% o crescimento das raízes (VALE et al., 2011). Neste sentido, a falta do N-nutriente apresenta forte impacto no crescimento e desenvolvimento e a proteína S-8 auxilia na regulação da fotossíntese e ajuda na sinalização parte-aérea/raiz, a fim de transmitir a falta do N-nutriente e metabolizar este nutriente (QUE et al., 2011; TAKAHASHI; SHINOZAKI, 2019).

Quando as plantas foram inoculadas com ST e fertilizadas com Mo o acúmulo de proteínas ligadas à síntese e ao transporte de hormônios (MS-2; MS-3), crescimento da planta e armazenamento de fotossintatos (MS-3) foram maiores e se sobressaíram em relação as proteínas anteriormente citadas acumuladas na inoculação (Tabela 07; Figura 11).

A MS-2 é uma proteína de domínio de ligação ao DNA altamente conservado nas plantas e que compõem as proteínas BfII, EcoRII e B3. As proteínas do domínio B3 são específicas para plantas e estão ligadas a fatores de transcrição específicos que apresentam funções relacionadas principalmente a resposta hormonal de auxinas e ácido abscísico (YAMASAKI et al., 2013). Ainda, um importante transportador específico de auxinas foi encontrado nesta pesquisa com a aplicação de Mo: O ABC B19 (MS-8).

Nas plantas esse transportador de alta afinidade compreende um domínio transmembranar seguido por um local de ligação de nucleotídeo citoplasmático e sua importância está em regular a importação e exportação de hormônios vegetais na planta atuando no crescimento, alongamento e estímulo do ápice da raiz (KERR; CARRIER; TWYLCROSS, 2010).

As enzimas invertase (MS-3) desempenham um papel fundamental no acúmulo de sacarose o que contribui para a melhoria do rendimento e recuperação do açúcar na cana-de-açúcar (SHIVALINGAMURTHY et al., 2018). Contudo, quando associado ao aumento dos hormônios de crescimento, o que ocorreu nesta pesquisa, possui papel crucial no desenvolvimento de parte aérea e raiz da cultura (RUAN et al., 2010; LEITE et al., 2015).

É possível notar que, em geral, o crescimento e desenvolvimento da planta, bem como o metabolismo de N da cana-de-açúcar são afetados com a inoculação (Figura 11). Outras pesquisas também mostram a ação das bactérias nesses mesmos mecanismos como Silveira et al. (2016) que com o objetivo de estudar o impacto de três bactérias endofíticas diazotróficas no metabolismo, fisiologia e crescimento de plantas de trigo em experimento de casa de vegetação, mostram que de maneira geral, a inoculação afeta o metabolismo do N e o crescimento das plantas.

Da mesma forma, em experimentos conduzidos em área de cultivos comerciais com cana-de-açúcar em solos de textura média Schultz et al. (2016) observaram incremento de

22,4% na produtividade da variedade RB72454 em resposta à inoculação de BPCP na segunda soca de solos de textura média.

Em uma outra perspectiva, na mesma pesquisa de Schultz et al. (2016) não observaram incrementos para a variedade RB867515. Pereira et al. (2013) avaliando seis variedades de cana-de-açúcar em campo experimental mostram que na variedade RB867515 houve resposta a inoculação semelhante no acúmulo de matéria seca, contudo não teve relação direta com o acúmulo de nitrogênio nessa variedade.

Esses resultados mostram que, principalmente em condições de campo, a relação entre acúmulo de biomassa e N são pequenos e inconsisos. Por isso, alternativas que promovam maior eficiência do processo no desenvolvimento da cultura têm sido buscadas. Neste segmento, o Mo pode interferir diretamente em processos chaves que envolvem as contribuições das bactérias para as plantas, bem como os processos ligados à assimilação do N na planta e são considerados essenciais a ambos organismos (KOVÁCS et al., 2015; FORLI et al., 2018; ZHOU et al., 2017).

Aqui, quando o micronutriente Mo foi aplicado em conjunto com a inoculação de ST passam a ser acumuladas mais proteínas ligadas ao estímulo hormonal do ABA e AIA (Figura 11).

No que se se refere aos hormônios vegetais, é observado que na planta estes modificam o estado fisiológico das células, dos tecidos e, em alguns casos de sistemas mais complexos (PARK et al., 2017). Neste contexto, a depender da fase de desenvolvimento que a planta se encontra, o mesmo hormônio pode produzir diferentes respostas na planta.

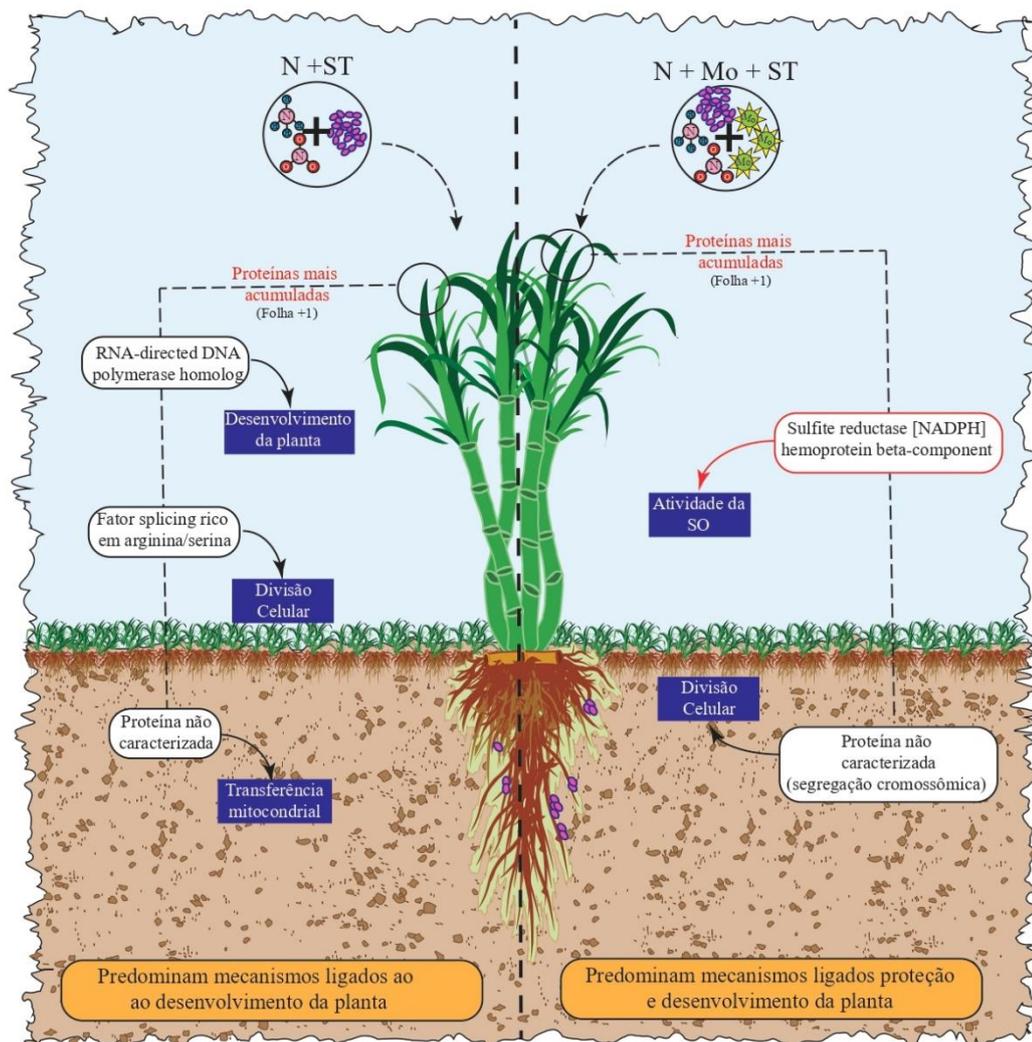
Alguns hormônios, como AIA e o etileno apresentam uma interação clássica na regulação de processos de desenvolvimento da planta (MUDAY; RAHMAN; BINDER, 2012; TAVARES et al., 2018). A interação auxina/etileno está envolvida com o desenvolvimento das raízes laterais, na arquitetura das raízes e no alongamento dos pelos radiculares (MUDAY; RAHMAN; BINDER, 2012).

Outro hormônio, o ABA, está relacionado com os processos fisiológicos de fechamento dos estômatos atuando principalmente em condições de estresse hídrico (FERREIRA et al., 2017). Além disso, a interação entre etileno e ABA também influencia no desenvolvimento de raízes laterais (SHKOLNIK-INBAR; BAR-ZVI, 2010) e na formação do eixo embrionário (BELIN et al., 2009).

Portanto, o incremento desses hormônios por organismos promotores de crescimento associado ao Mo são um estímulo ao desenvolvimento radicular da cana-de-açúcar, bem como

auxilia na produtividade da cultura, uma vez que a planta terá um desenvolvimento mais adequado e apresentará maior biomassa.

A introdução do N no sistema planta associado ao inoculante ST altera o acúmulo de proteínas, contudo a proteína de fator de splicing rico em arginina/serina continuou a ser acumulada (S-9). Também, foi encontrada uma proteína que desempenha papel na regulação do desenvolvimento (S-10) e proteínas envolvidas com transferência mitocondrial (S-11) (Tabela 07; Figura 12).



**Figura 12.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) a aplicação de N e inoculação de ST (B) aplicação de N e Mo e inoculação de ST (Comparação B). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas azuis funções das proteínas na planta. O contorno vermelho indica que a proteína encontrada foi de bactéria. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; ST: *Stenotrophomonas* sp. (Fonte: Elaborada pela autora).

As polimerases de RNA (S-10) são enzimas que catalisam a formação de RNA, usando como molde uma cadeia de DNA e estão associadas às respostas da cana-de-açúcar ao desenvolvimento (VANNINI; CRAMER, 2012). Nos eucariotos existem três tipos de RNA

polimerase que estão relacionadas à transcreve genes de rRNA, transcreve genes que codificam para pre-mRNA que será traduzido em proteínas no citoplasma e transcreve outros RNA funcionais tais como RNA de transferência (tRNA) (VANNINI; CRAMER, 2012). A I e II estão envolvidas com a síntese de proteínas (KHATTER; VORLÄNDER; MÜLLER, 2017).

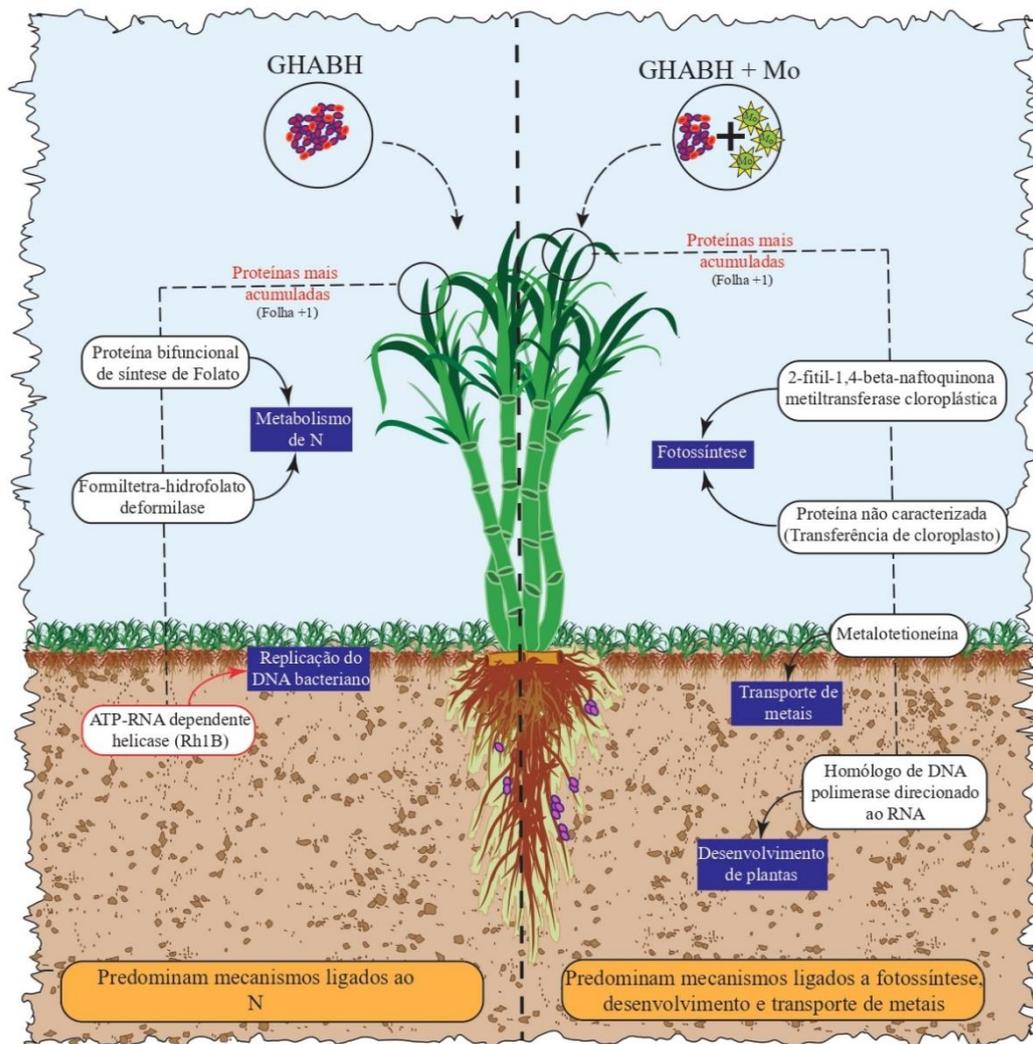
Na interação tripla com a ST, Mo e N foram acumuladas proteínas ligadas ao domínio de segregação cromossômica ATPase (MS-11) e SO (MS-9). O conjunto proporcionou maiores acúmulos do SO (MS-9) na bactéria quando associado a bactéria inoculada. Essa é uma molibdoenzima dependente do grupo pterina orgânica que oxida sulfito em sulfato e transfere elétrons produzidos na cadeia de transporte de elétrons, permitindo a geração de ATP por fosforilação oxidativa (WANG et al., 2015; RAWAL; PUNDIR, 2019).

Além disso, a ausência de atividade da SO, provoca transferência de elétrons para a formação ânions superóxidos e peróxidos de hidrogênio (BYRNE et al., 2009; HÄNSCH et al., 2006) e a aplicação de molibdênio auxilia na tolerância das plantas à estresses bióticos e abióticos, uma vez que aumenta a atividade da SO nas bactérias que reduzem esse efeito do sulfito tóxico nas folhas (SHARMA et al., 2020).

A introdução do N no sistema em conjunto com a ST, independentemente da atuação ou não do Mo provocou maior atuação no crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar (Figura 12).

Neste contexto, alguns autores demonstram o papel crucial do N na cana-de-açúcar como Vale et al. (2011) que apresenta o papel do nutriente no acúmulo de matéria seca e desenvolvimento das raízes da cultura, como Saleem et al. (2012) na brotação e perfilhamento da cana-de-açúcar, como Bell, Wood e Moody (2014) no desenvolvimento e produtividade. Manhães et al., (2015) destacam que dentre os nutrientes minerais os mais importantes para o perfilhamento e produtividade são o N e o fósforo.

Em outra expectativa, quando foi realizada a inoculação de GHABH foram acumuladas proteínas ligadas ao metabolismo e síntese das purinas (G-4; G-5) e relacionadas à replicação do DNA (G-6) (Tabela 08; Figura 13). Proteínas ligadas a síntese de purinas, como a Proteína bifuncional de síntese de folato e a formiltetra-hidrofolato deformilase (G-4; G-5) apresentam função atuantes no metabolismo de N (Figura 13).



**Figura 13.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) a inoculação de GHABH (B) aplicação de Mo e inoculação de GHABH (Comparação C). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas azuis funções das proteínas na planta. O contorno vermelho indica que a proteína encontrada foi de bactéria. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora).

A síntese de folatos (G-4), promove maior acúmulo de formiltetra-hidrofolato (G-5) proteína que está envolvida com o metabolismo da histidina. Esse aminoácido pode ser sintetizado por plantas e bactérias e desempenha um papel crítico na formação de amônia durante o metabolismo das plantas e afetam o crescimento e desenvolvimento. (CAMARA et al., 2011; INGLE, 2011; EKINCI et al., 2014). Além disso, as histidinas também apresentam papel fisiológico como quelantes e transportadores de íons metálicos, como o Mo (STEPANSKY; LEUSTEK, 2006). Neste ambiente de maior aporte de N as bactérias GHABH se reproduziram, fato que pode ser confirmado em virtude do acúmulo de proteínas ligadas a replicação do DNA bacteriano (G-6) (XU et al., 2018)

Já quando a inoculação do conjunto de bactérias GHABH foi realizada em associação ao Mo foram acumuladas proteínas de melhoria do sistema fotossintético e melhoria no desenvolvimento da planta (Figura 13). O maior acúmulo da proteína MG-1 e MG-9 está relacionada a maior estabilidade e rotatividade do fotossistema I, o que influencia os complexos funcionais do fotossistema II e permite uma melhor eficiência de conversão da radiação solar em biomassa (LOHMANN et al., 2006; FERREIRA JUNIOR et al., 2012). Em plantas de trigo bactérias *Nitrospirillum brasilense*, *Achromobacter insolitus* e *Zoogloea ramigera* foram capazes de melhorar os teores de clorofila da planta (Silveira et al., 2016).

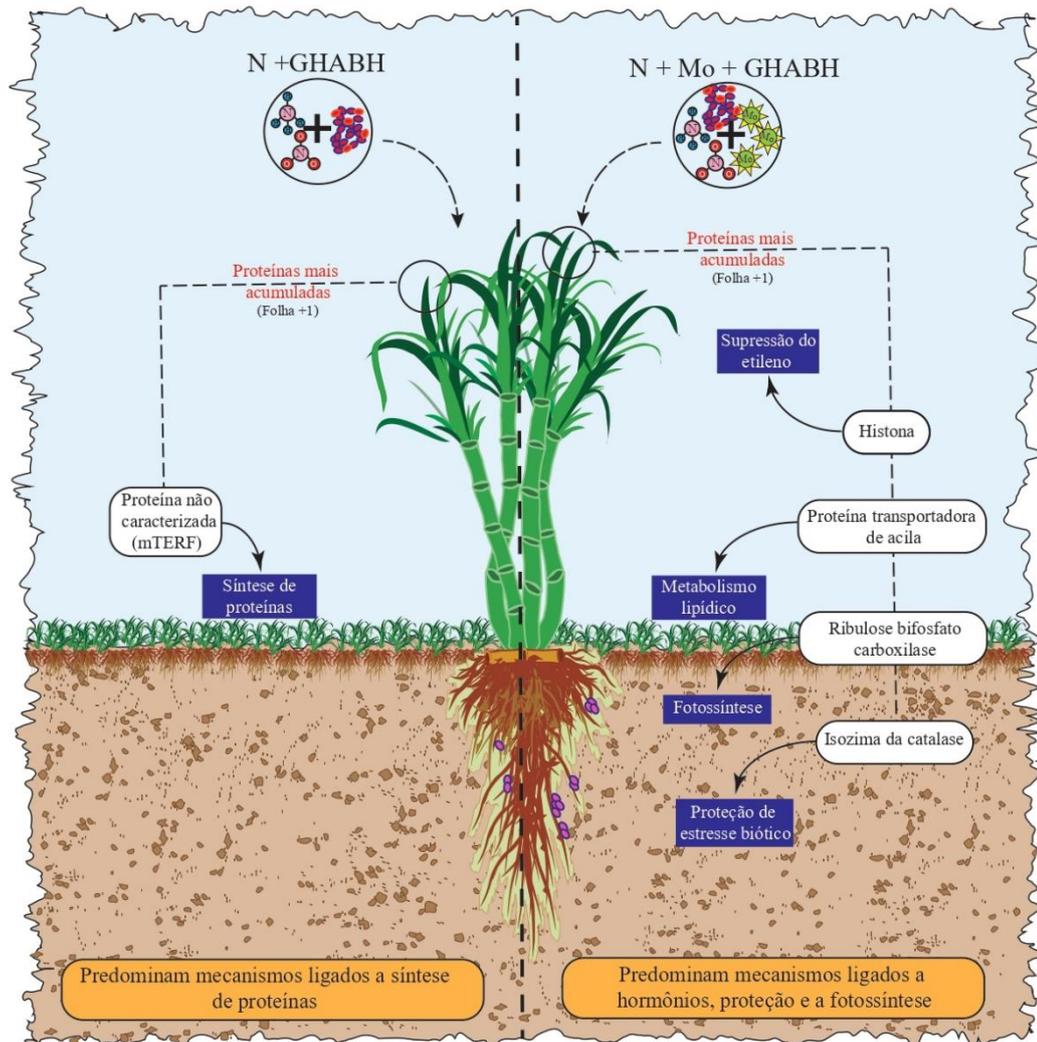
Uma proteína que desempenha importantes processos de desenvolvimento em plantas regulando genes em arroz também foi aqui encontrada com a inoculação de GHABH e Mo (MG-8), cujo acúmulo é modulado por processos do RNA (KAPOOR et al., 2008).

Em relação as metalotioneínas vegetais aqui encontradas (MG-2) estão relacionadas à homeostase de íons metálicos e ajuste de transporte de metais, podendo auxiliar no ajuste do teor de Mo na planta (GUO et al., 2013).

Com a introdução do N no sistema planta associado ao conjunto de bactérias GHABH apenas a proteína (G-16) foi identificada. As proteínas mTERF são um grupo heterogêneo de proteínas que controlam a eficiência do alongamento transcrito de subconjuntos de genes pela RNA polimerase II que estão envolvidas com a síntese de proteínas (ANTOSZ et al., 2017; KHATTER; VORLÄNDER; MÜLLER, 2017).

Na interação tripla com a GHABH, Mo e N foram acumuladas proteínas ligadas a processos de regulação de proteínas (MG-10: Histona H1.2), processo metabólico lipídico (MG-11: Proteína transportadora acila 2, precursora de cloroplasto, putativa, expressa) desenvolvimento de plantas (MG-13: Homólogo de DNA polimerase direcionado a RNA), fotossíntese (MG-14: Cadeia grande de bifosfato carboxilase de ribulose), antioxidação (MG-16: Isozima da catalase 3) (Tabela 08; Figura 14).

A proteína transportadora de acila 2 atua no processo metabólico lipídico e está envolvida em cada passo da síntese de ácidos graxos pelo sistema citoplasmático (DOMERGUE et al., 2010).



**Figura 14.** Mecanismo de atuação de bactérias promotoras de crescimento de plantas que induzem alterações no acúmulo de proteínas diferenciais foliar na cana-de-açúcar da variedade RB867515 quando submetidas (A) a aplicação de N e inoculação de GHABH (B) aplicação de N e Mo e inoculação de GHABH (Comparação D). Caixas brancas indicam proteínas acumuladas e caixas azuis funções das proteínas na planta. N: Nitrogênio; Mo: Molibdênio; GHABH: G: *Gluconacetobacter diazotrophicus*; H: *Herbaspirillum seropedicae*; A: *Azospirillum amazonense*; B: *Burkholderia tropica*; H: *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. (Fonte: Elaborada pela autora).

As histonas são os principais componentes estruturais do nucleossomo e envolvem interações na cromatina, sendo alvo de proteínas de regulação (MORAES et al., 2015). Elas são essenciais para a regulação gênica e tem sido reportada como reguladora de resposta hormonais nas plantas, principalmente no que se refere a supressão de etileno (WANG et al., 2017).

Apesar de ser uma enzima ligada a estresse abióticos a isozima da catalase (MG-16) pode ser relacionada com estresses bióticos (SU et al., 2014). Santos et al. (2010) investigando proteínas acumuladas com a inoculação de *Gluconacetobacter diazotrophicus* encontrou incremento desta enzima em relação ao tratamento controle. A manutenção do status oxidativo

é muito importante para a interação bacteriana com a planta, pois reativa espécies de oxigênio que são geradas pelas plantas para proteger contra bactérias invasoras.

Dessa forma, a interação tripla atuou principalmente em repostas hormonais de etileno, no metabolismo de ácidos graxos e na sinalização entre a planta e o inoculante (Figura 14).

Mudanças no nível de etileno, sua percepção e o mecanismo hormonal regulam o crescimento das plantas. Reduções induzidas por etileno no crescimento da folha foram relatadas em plantas de ervilha (*Pisum sativum*) quando inoculadas com bactérias. Na planta a atividade da ACC desaminase foi aumentada e a do etileno reduzida, como consequência (BELIMOV et al., 2009).

Na cultura do arroz, Bal, Nayak e Adhya, (2013) avaliando o efeito dos PGPR na germinação de sementes de arroz e no crescimento de plântulas observaram que houve maior crescimento da parte aérea e da raiz e do conteúdo de clorofila quando bactérias produtoras de ACC desaminase reduziram a produção de etileno. Ainda, o efeito do etileno no crescimento e desenvolvimento da folha pode ser dependente de sua interação com outros hormônios como mostram Iqbal et al., (2017).

## 5 CONCLUSÕES

- A aplicação de Mo associado às BPCP eleva o acúmulo de proteínas diferenciais relacionadas à mecanismos hormonais e fotossíntese na cultura da cana-de-açúcar;
- A inoculação atua no acúmulo de proteínas relacionadas a absorção e metabolismo de N na cana-de-açúcar;
- A inoculação e a aplicação de Mo auxiliam no desenvolvimento vegetal;
- A bactéria ST em associação do Mo atuam como promotor de crescimento de plantas na cana-de-açúcar e têm potencial para serem desenvolvidos como inoculantes para integrar o manejo da cultura;
- Para a aplicação de ST e GHABH associado ao Mo as proteínas MS-2, MS-3, MS-8 e MS-9 e MG-2, e MG-10 respectivamente, são possíveis biomarcadores funcionais na cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

ADRIANO, D. C. Molybdenum. In: **Trace elements in the terrestrial environment: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals**. D.C. Adriano (ed.), cap 15, 2nd ed., p. 587 – 624, 2001. <<https://doi.org/10.1002/food.19870310321>>.

AGUIAR, N. O.; OLIVARES, F. L.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P. Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. **PeerJ**, v. 2018, n. 9, p. 1–28, 2018. <[doi: 10.7717/peerj.5445](https://doi.org/10.7717/peerj.5445)>.

ANTOSZ, W., PFAB, A., EHRNSBERGER, H. F., HOLZINGER, P., KÖLLEN, K., MORTENSEN, S. A., BRUCKMANN, A.; SCHUBERT, T.; LÄNGST, G.; GRIESENBECK, J.; SCHUBERT, V.; GRASSER, K. D. The composition of the arabidopsis RNA polymerase II transcript elongation complex reveals the interplay between elongation and mRNA processing factors. **Plant Cell**, v. 29, n. 4, p. 854–870, 2017. <<https://doi.org/10.1105/tpc.16.00735>>.

ANTUNES, J. E. L.; LYRA, M. C. C. P.; OLLERO, F. J.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, L. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1–10, 2017. <[doi: 10.4238/gmr16029662](https://doi.org/10.4238/gmr16029662)>.

APAC - Agência Pernambucana de Águas e Clima. **Agrometeorologia**. Disponível em: <<https://www.apac.pe.gov.br/>>. Acesso em: 22 nov. 2019b.

APAC - Agência Pernambucana de Águas e Clima. **Dados temperatura e umidade**. Destinatário: Ericka Vanessa Silva de Melo, Gestora de Articulação e comunicação, <[ericka.melo@apac.pe.gov.br](mailto:ericka.melo@apac.pe.gov.br)>. Mensagem recebida por Magda A. da Silva, <[mf.silva@agronoma.eng.br](mailto:mf.silva@agronoma.eng.br)> em 03 dez. 2019a. Mensagem eletrônica.

APHA, 2012. **Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater**, 22<sup>nd</sup> Ed.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington, DC. 724 p.

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

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

BAL, H. B.; NAYAK, L.; DAS, Sd.; ADHYA, T. K. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 93–105, 2013. <<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1402-5>>.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>>.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DÖBEREINER, J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 365, 1984.

BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Localization of *Herbaspirillum* spp. and *Burkholderia* sp. in rice root system. In: International Symposium on Microbiol Ecology, 7, Santos, SP, Brasil, 133 p., 1995.

BELIMOV, A. A.; DODD, I. C.; HONTZEAS, N.; THEOBALD, J. C.; SAFRONOVA, V. I.; DAVIES, W. J. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. **New Phytologist**, v. 181, p. 413–423, 2009. <<https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02657.x>>.

BELIN, C.; MEGIES, C.; HAUSEROVA, E.; LOPEZ-MOLINA, L. Abscisic acid represses growth of the *Arabidopsis embryonic* axis after germination by enhancing auxin signaling. **The Plant Cell**, v. 21, p. 2253–2268, 2009. <[www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.067702](http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.109.067702)>.

BELL M. J., WOOD A., MOODY P. Introduction and trends in nitrogen fertilizer use. In: **A Review of Nitrogen Use Efficiency in Sugarcane**. (Ed.) Bell M. J. Brisbane, QLD: Sugar Research Australia; p. 8–13, 2014. <<http://hdl.handle.net/11079/14735>>.

BITTNER, F. Molybdenum metabolism in plants and crosstalk to iron. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, 2014. <[doi:10.3389/fpls.2014.00028](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00028)>.

BOARETTO, L. F. **Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose**. 2012. 177 p. Tese (Doutorado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, Brasil, 2012.

BOUYOUCOS, G. J. Estimation of the colloidal material in soils. **Science**, v. 64, p. 362, 1926. <[doi: 10.1126 / science.64.1658.362](https://doi.org/10.1126/science.64.1658.362)>.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C., PACHECO, F., ALJANABI, S. M. M., MONTEIRO, R. A., CRUZ, L. M., BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M.; WASSEM, R. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 113–125, 2011. <<https://doi.org/10.1007/s11104-011-1044-z>>.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C., GILARD, F., BRULÉ, L., QUILLERÉ, I., GOURION, B., RATET, P., SOUZA, E. M. DE.; LEA, P. J.; HIREL, B. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–19, 2017. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174576>>.

BYRNE, R. S.; HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R.; HILLE, R. Oxidative half-reaction of *Arabidopsis thaliana* sulfite oxidase: Generation of superoxide by a peroxisomal enzyme. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 51, p. 35479–35484, 2009. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067355>>.

CACEFO, V.; RIBAS, A. F.; ZILLIANI, R. R.; NERIS, D. M.; DOMINGUES, D. S.; MORO, A. L.; VIEIRA, L. G. E. Decarboxylation mechanisms of C<sub>4</sub> photosynthesis in *Saccharum* spp.: Increased PEPCK activity under water-limiting conditions. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019. <<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1745-7>>.

CAMARA, D.; RICHEFEU-CONTESTO, C.; GAMBONNET, B.; DUMAS, R.; RÉBEILLÉ, F. The synthesis of pABA: Coupling between the glutamine amidotransferase and aminodeoxychorismate synthase domains of the bifunctional aminodeoxychorismate synthase from *Arabidopsis thaliana*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 505, n. 1, p. 83–90, 2011. <<https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.010>>.

CANELLAS, L. P.; BALMORI, D. M.; MÉDICI, L. O.; AGUIAR, N. O.; CAMPOSTRINI, E.; ROSA, R. C. C.; FAÇANHA, A. R.; OLIVARES, F. L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 2013. <<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1382-5>>.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L. Production of border cells and colonization of maize root tips by *Herbaspirillum seropedicae* are modulated by humic acid. **Plant and Soil**, v. 417, n. 1–2, p. 403–413, 2017. <[doi: 10.1007 / s11104-017-3267-0](https://doi.org/10.1007/s11104-017-3267-0)>.

CARMONA, E.; VARGAS, D.; BORROTO, C. J.; LOPEZ, J.; FERNÁNDEZ, A. I.; ARENCIBIA, A.; BORRÁS-HIDALGO, O. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression during the interaction between sugarcane and *Puccinia melanocephala*. **Plant Breeding**, v. 123, n. 5, p. 499–501, 2004. <<https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2004.00935.x>>.

CASTRO-GONZÁLEZ, R.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; RAMÍREZ-TRUJILLO, A.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J. High diversity of culturable *Burkholderia* species associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v. 345, n. 1, p. 155–169, 2011. <<https://doi.org/10.1007/s11104-011-0768-0>>.

CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant Soil**, v. 108, p. 23–31, 1988. <[doi:10.1007/BF02370096](https://doi.org/10.1007/BF02370096)>.

CHAVES, V. A.; DOS SANTOS, S. G.; SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; REIS, V. M. Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1595–1602, 2015. <<https://doi.org/10.1590/01000683rbc20151144>>.

CHAWLA, N.; PHOUR, M.; SUNEJA, S.; SANGWAAN, S.; GOYAL, S. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: An overview. **Research in Environment and Life Sciences**, Nova York, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2014.

COHEN, A.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *Arabidopsis* plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p. 97–103, 2008. <[doi: 10.1007/s10725-007-9232-9](https://doi.org/10.1007/s10725-007-9232-9)>.

CORDEIRO, F. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; HUERGO, L. F.; DE OLIVEIRA PEDROSA; F., MONTEIRO, R. A.; DE SOUZA, E. M. Proteomic analysis of *Herbaspirillum seropedicae* cultivated in the presence of sugar cane extract. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 3, p. 1142–1150, 2013. <<https://doi.org/10.1021/pr300746j>>.

DEPOSITION, S.; ONO, J.; LEE, J. A.; ROWLAND, O.; BOURDON, M.; ALHATTAB, R.; LOWE, C. Three Arabidopsis Fatty Acyl-Coenzyme A Reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, Generate Primary Fatty Alcohols associated with Suberin Deposition. **Plant Physiology**, v. 153, p. 1539–1554, 2010. <<https://doi.org/10.1104/pp.110.158238>>.

DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I. E.; NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, p. 1464–1473, 1976. <doi: 10.1139/m76-217>.

DÖBEREINER, J.; PIMENTEL, J. P.; OLIVARES, F. L.; URQUIAGA, S. Bactérias diazotróficas podem ser endofíticas ou fitopatogênicas? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 62, p. 319, 1990.

DOMERGUE, F.; VISHWANATH, S. J.; JOUBÈS, J.; ONO, J.; LEE, J. A.; BOURDON, M.; ALHATTAB, R.; LOWE, C.; PASCAL, S.; LESSIRE, R.; ROWLAND, O. Three Arabidopsis Fatty Acyl-Coenzyme A Reductases, FAR1, FAR4, and FAR5, Generate Primary Fatty Alcohols, v. 153, p. 1539–1554, 2010. <<https://doi.org/10.1104/pp.110.158238>>.

DUTTA, D.; PUZARI, K. C.; GOGOI, R.; DUTTA, P. Endophytes: Exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 5, p. 621–629, 2014. <<https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402043>>.

EKINCI, M.; YILDIRIM, E.; KOTAN, R.; DURSUN, A.; TURAN, M.; GÜNEŞ, A. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on growth, nutrient, organic acid, amino acid and hormone content of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) transplants. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, Lublin, v. 13, n. 6, p. 71–85, 2014.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solos**. 2 ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2017. 212p.

ETESAMI, H.; EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects - a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 897–911, 2017. <<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162017000400005>>.

FAN, B.; CHEN, X. H.; BUDI HARJO, A.; BLEISS, W.; VATER, J.; BORRIS, R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, v. 151, n. 4, p. 303–311, 2011. <doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.12.022>.

FERREIRA JUNIOR, R. A.; SOUZA, J. L. DE.; LYRA, G. B.; TEODORO, I.; SANTOS, M. A. DOS.; PORFIRIO, A. C. S. Crescimento e fotossíntese de cana-de-açúcar em função de variáveis biométricas e meteorológicas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 11, p. 1229–1236, 2012. <<https://doi.org/10.1590/s1415-43662012001100012>>.

FERREIRA, T. H. S.; TSUNADA, M. S.; BASSI, D.; ARAÚJO, P.; MATTIELLO, L.; GUIDELLI, G. V.; RIGHETTO, G. L.; GONÇALVES, V. R.; LAKSHMANAN, P.; MENOSSI, M. Sugarcane Water Stress Tolerance Mechanisms and Its Implications on Developing Biotechnology Solutions. **Frontiers Plant Science**, v. 8, p. 1077., 2017. <doi: 10.3389/fpls.2017.01077>.

FINKA, A.; GOLOUBINOFF, P. Proteomic data from human cell cultures refine mechanisms of chaperone-mediated protein homeostasis. **Cell Stress and Chaperones**, v. 18, n. 5, p. 591–605, 2013. <doi: 10.1007/s12192-013-0413-3>.

FORLI, F.; OTTO, R.; VITTI, G. C.; VALE, D. W. DO; MIYAKE, R. T. M. Micronutrients application on cultivation of sugarcane billets. v. 12, n. 10, p. 790 – 794, 2018. <doi:10.5897/AJAR2016.11382>.

FOYER, C. H.; FERRARIO-MÉRY, S.; NOCTOR, G. Interactions Between Carbon and Nitrogen Metabolism. **Plant Nitrogen**, p. 237–254, 2001. <doi: 10.1007/978-3-662-04064-5\_9>.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.

GRAVELEY, B. R.; MANIATIS, T. Arginine/serine-rich domains of SR proteins can function as activators of pre-mRNA splicing. **Molecular Cell**, v. 1, n. 5, p. 765–771, 1998. <doi:10.1016/S1097-2765(00)80076-3>

GUO, J.; XU, L.; SU, Y.; WANG, H.; GAO, S.; XU, J.; QUE, Y. ScMT2-1-3, a metallothionein gene of sugarcane, plays an important role in the regulation of heavy metal tolerance/accumulation. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/904769>.

HÄNSCH, R.; LANG, C.; RIEBESEEL, E.; LINDIGKEIT, R. GESSLER, A.; RENNENBERG, H.; MENDEL, R. R. Plant sulfite oxidase as novel producer of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Combination of enzyme catalysis with a subsequent non-enzymatic reaction step. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 10, p. 6884–6888, 2006. <doi: 10.1074/jbc.M513054200>.

HILLE, R.; NISHINO, T.; BITTNER, F. Molybdenum enzymes in higher organisms. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 9–10, p. 1179–1205, 2011. <doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.034>.

HURKMAN, W. J.; TANAKA, C. K. Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Plant Physiology**, v. 81, n. 3, p. 802–806, 1986. <doi:10.1104/pp.81.3.802>.

ILYAS, N.; BANO, A. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 4, p. 393–406, 2010. <doi: 10.1007/s00374-009-0438-z>.

IMAM, J.; SHUKLA, P.; MANDAL, N. P.; VARIAR, M. Microbial Interactions in Plants: Perspectives and Applications of Proteomics. **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, n. 9, 2017. <https://doi.org/10.2174/1389203718666161122103731>.

INGLE, R. A. Histidine Biosynthesis. **The Arabidopsis Book**, v. 9, p. e0141, 2011. <doi: 10.1199/tab.0141>.

INTORNE, A. C.; OLIVEIRA, M. V. V. DE.; LIMA, M. L.; DA SILVA, J. F.; OLIVARES, F. L.; SOUZA FILHO, G. A. DE. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 5, p. 477–483, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0472-0>.

IOBBI-NIVOL, C.; LEIMKÜHLER, S. Molybdenum enzymes, their maturation and molybdenum cofactor biosynthesis in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 8–9, p. 1086–1101, 2013. <doi: 10.1016/j.bbabi.2012.11.007>.

IQBAL, N.; KHAN, N. A.; FERRANTE, A.; TRIVELLINI, A.; FRANCINI, A.; KHAN, M. I. R. Ethylene role in plant growth, development and senescence: interaction with other phytohormones. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. April, p. 1–19, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00475>.

JOHNSTONE, T. C.; NOLAN, E. M. Beyond Iron: Non-Classical Biological Functions of Bacterial Siderophores. **Physiology & behavior**, v. 44, n. 14, p. 6320 – 6339, 2017. <doi: 10.1039 / c4dt03559c>.

KALAYU, G. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. **International Journal of Agronomy**, v. 2019, 2019. <doi: 10.1155 / 2019/4917256>.

KAPOOR, M.; ARORA, R.; LAMA, T.; NIJHAWAN, A.; KHURANA, J. P.; TYAGI, A. K.; KAPOOR, S. Genome-wide identification, organization and phylogenetic analysis of Dicer-like, Argonaute and RNA-dependent RNA Polymerase gene families and their expression analysis during reproductive development and stress in rice. **BMC Genomics**, v. 9, p. 1–17, 2008. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-451>.

KAVAMURA, V. N., SANTOS, S. N., SILVA, J. L. DA, PARMA, M. M., ÁVILA, L. A., VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANIA, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. DE. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v. 168, n. 4, p. 183–191, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.002>.

KERR, I. D.; CARRIER, D.J.; TWYXCROSS, J. Hormone Transport. **The Plant Plasma Membrane**, v. 19, n. November 2010, p. 353–377, 2011. <doi: 10.1007 / 978-3-642-13431-9\_17>.

KEUTER, A.; VELDKAMP, E.; CORRE, M. D. Asymbiotic biological nitrogen fixation in a temperate grassland as affected by management practices. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 70, p. 38–46, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.12.009>.

KHATTER, H.; VORLÄNDER, M. K.; MÜLLER, C. W. RNA polymerase I and III: similar yet unique. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 47, p. 88–94, 2017. <doi: 10.1016/j.sbi.2017.05.008>.

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

KIRKBY, E. Introduction, Definition and Classification of Nutrients. In: **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants**. P. Marschner (ed.), Cap 1, Elsevier Ltd, 3th ed., p. 3 – 5, 2012.

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

KOMATSU, S. Plant proteomic research 2.0: Trends and perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 10, p. 0–4, 2019. <doi: 10.3390 / ijms20102495>.

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

KOVÁCS, B.; PUSKÁS-PRESZNER, A.; HUZSVAI, L.; LÉVAI, L.; BÓDI, É. Effect of molybdenum treatment on molybdenum concentration and nitrate reduction in maize seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 96, p. 38–44, 2015. <doi: 10.1016 / j.plaphy.2015.07.013>.

KUDOYAROVA, G.R.; ARKHIPOVA, T.N.; MELENĚEV, A.I. Role of Bacterial Phytohormones in Plant Growth Regulation and Their Development. In: **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**. (Ed) Maheshwari, Dinesh K., v. 12, n. February 2017, p. 337–349, 2015. <doi: 10.1007 / 978-3-319-24654-3>.

KUNKEL, B. N.; HARPER, C. P. The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 2, p. 245–254, 2018. <doi: 10.1093 / jxb / erx447>.

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. <https://doi.org/10.2134/agronj1941.00021962003300110005x>.

LEITE, G. H. P.; ALEXANDRE, C.; CRUSCIOL, C.; SIQUEIRA, G. F. DE; SILVA, M. A. DE. Plant regulators and invertase activity in sugarcane at the beginning of the harvest season | Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana de açúcar no início da safra. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 10, p. 1788–1794, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141363>.

LERY, L. M. S., COELHO, A., VON KRUGER, W. M. A., GONÇALVES, M. S. M., SANTOS, M. F., VALENTE, R. H.; SANTOS, E. O.; ROCHA, S. L. G.; PERALES, J.; DOMONT, G. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; BISCH, P. M. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. **Proteomics**, v. 8, n. 8, p. 1631–1644, 2008. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700912>.

LERY, L. M. S.; HEMERLY, A. S.; NOGUEIRA, E. M.; VON KRÜGER; W. M. A.; BISCH, P. M. Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* and Sugarcane. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 5, p. 562–576, 2011. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0178>.

LIBAULT, M.; PINGAULT, L.; ZOGLI, P.; SCHIEFELBEIN, J. Plant Systems Biology at the Single-Cell Level. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 11, p. 949–960, 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.08.006>>.

LIMA, D. R. M. DE, SANTOS, I. B. DOS, OLIVEIRA, J. T. C., BARBOSA, J. G., DINIZ, W. P. DA S., FARIAS, A. R. B. DE.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Tolerance of potentially diazotrophic bacteria to adverse environmental conditions and plant growth-promotion in sugarcane. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 11, p. 1534–1548, 2018. <<https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1443212>>.

LIN, W., WU, L., LIN, S., ZHANG, A., ZHOU, M., LIN, R.; WANG, H.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; LIN, R. Metaproteomic analysis of ratoon sugarcane rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013. <<https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-135>>.

LIU, Y.; LU, S.; LIU, K.; WANG, S.; HUANG, L.; GUO, L. Proteomics: A powerful tool to study plant responses to biotic stress. **Plant Methods**, v. 15, n. 1, p. 1–20, 2019. <<https://doi.org/10.1186/s13007-019-0515-8>>.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 3, p. 606–618, 2011. <[doi: 10.1007 / s00248-010-9780-9](https://doi.org/10.1007/s00248-010-9780-9)>.

LOHMANN, A.; SCHÖTTLER, M. A.; BRÉHÉLIN, C.; KESSLER, F.; BOCK, R.; CAHOON, E. B.; DÖRMANN, P. Deficiency in phyloquinone (vitamin K1) methylation affects prenyl quinone distribution, photosystem I abundance, and anthocyanin accumulation in the Arabidopsis AtmenG mutant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 52, p. 40461–40472, 2006. <<https://doi.org/10.1074/jbc.M609412200>>.

LUDWIG-MÜLLER, J. Bacteria and fungi controlling plant growth by manipulating auxin: Balance between development and defense. **Journal of Plant Physiology**, v. 172, p. 4?12-12, 2015. <[doi: 10.1007/978-3-642-13431-9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-13431-9)>.

MAGALHÃES, F. M.M. et al. A new acid tolerant *Azospirillum* species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 55, p. 417–430, 1983.

MAJEED, A.; MUHAMMAD, Z.; AHMAD, H. Plant growth promoting bacteria: role in soil improvement, abiotic and biotic stress management of crops. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 12, p. 1599–1609, 2018. <<http://dx.doi.org/10.1007/s00299-018-2341>>.

MANHÃES, C. M. C.; GARCIA, R. F.; FRANCELINO, F. M. A.; FRANCELINO, H. DE O.; COELHO, F. C. Factors that affect sprouting and tillering of sugar cane. **Revista Vértices**, v. 17, n. 1, p. 163–181, 2015. <<https://doi.org/10.5935/1809-2667.20150011>>.

MAROLI, A. S.; GAINES, T. A.; FOLEY, M. E.; DUKE, S. O.; DOĞRAMACI, M.; ANDERSON, J. V.; HORVATH, D. P.; CHAO, W. S.; THARAYIL, N. Omics in Weed Science: A Perspective from Genomics, Transcriptomics, and Metabolomics Approaches. **Weed Science**, v. 66, n. 6, p. 681–695, 2018. <<https://doi.org/10.1017/wsc.2018.33>>.

MAY, A.; MOREIRA, B. R. A.; MASCARIN, G. M.; VIANA, R. S.; SANTOS, M. S.; SILVA, E. H. F. M.; RAMOS, N. P.; SOARES DE MELO, I. Induction of drought tolerance by inoculation of *Bacillus aryabhatai* on sugarcane seedlings. **Cientifica**, v. 47, n. 4, p. 400–410, 2019. <<https://doi.org/10.15361/1984-5529.2019v47n4p400-410>>.

MEENAKSHISUNDARAM, M.; SANTHAGURU, K. Isolation and nitrogen fixing efficiency of a novel endophytic diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* associated with *Saccharum officinarum* from southern districts of Tamil Nadu. **International Journal of Biological & Medical Research**, Nova Delhi, v. 1, n. 4, p. 298-300, 2010.

MENDEL, R. R. Cell biology of molybdenum in plants. **Plant Cell Reports**, v. 30, n. 10, p. 1787–1797, 2011. <[doi: 10.1007/s00299-011-1100-4](https://doi.org/10.1007/s00299-011-1100-4)>.

MENDEL, R. R.; LEIMKÜHLER, S. The biosynthesis of the molybdenum cofactors. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 337–347, 2015. <[doi: 10.1007/s00775-014-1173-y](https://doi.org/10.1007/s00775-014-1173-y)>.

MONTEIRO, R. A., BALSANELLI, E., WASSEM, R., MARIN, A. M., BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C., SCHMIDT, M. A.; TADRA-SFEIR, M. Z.; PANKIEVICZ, V. C.S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F. O.; SOUZA, E. M. *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 175–196, 2012. <<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1125-7>>.

MORAES, I.; YUAN, Z. F.; LIU, S.; SOUZA, G. M.; GARCIA, B. A.; CASAS-MOLLANO, J. A. Analysis of histones H3 and H4 reveals novel and conserved post-translational modifications in sugarcane. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–25, 2015. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134586>>.

MUDAY, G. K.; RAHMAN, A.; BINDER, B. Auxin and ethylene: collaborators or competitors? **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 4, p. 181-195, 2012. <[doi: 10.1016/j.tplants.2012.02.001](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.001)>.

NUMAN, M.; BASHIR, S.; KHAN, Y.; MUMTAZ, R.; SHINWARI, Z. K.; KHAN, A. L.; KHAN, A.; AL-HARRASI, A. Plant growth promoting bacteria as an alternative strategy for salt tolerance in plants: A review. **Microbiological Research**, v. 209, n. January, p. 21–32, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.003>>.

O'LEARY, B.; PARK, J.; PLAXTON, W. C. The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): Recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. **Biochemical Journal**, v. 436, n. 1, p. 15–34, 2011. <[doi: 10.1042/BJ20110078](https://doi.org/10.1042/BJ20110078)>.

OLIVARES, F. L.; JAMES, E. K.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, v. 135, n. 4, p. 723–737, 1997. <<https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00684.x>>.

OLIVEIRA, A. L. M.; CANUTO, E.; de L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. SUPPL. 1, p. 59–61, 2003. <doi: 10.1590/S1517-83822003000500020>.

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

PARK, J.; LEE, Y.; MARTINOIA, E.; GEISLER, M. Plant hormone transporters: What we know and what we would like to know. **BMC Biology**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2017. <doi: 10.1186/s12915-017-0443-x>.

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPÓLITO, G. DE S.; DOS SANTOS, C. L. R.; REIS, V. M. Acúmulo de biomassa em variedades de cana-de-açúcar inoculadas com diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 44, n. 2, p. 363–370, 2013a. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902013000200020>.

PREMACHANDRA, D.; HUDEK, L.; BRAU, L. Bacterial Modes of Action for Enhancing of Plant Growth. **Journal of Biotechnology & Biomaterials**, v. 6, n. 3, p. 1 – 8, 2016. <doi: 10.4172/2155-952X.1000236>.

QUE, Y.; XU, L.; LIN, J.; RUAN, M.; ZHANG, M.; CHEN, R. Differential protein expression in sugarcane during sugarcane- *sporisorium scitamineum* interaction revealed by 2-DE and MALDI-TOF-TOF/MS. **Comparative and Functional Genomics**, v. 2011, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/989016>.

RAWAL, R.; PUNDIR, C. S. Purification and properties of sulfite oxidase from different sources: a mini review. v. 6, n. 1, p. 16–20, 2019. <doi:10.15406/jabb.2019.06.00169>.

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 nov. 2019.

RITCHIE, M. D.; HOLZINGER, E. R.; LI, R., PENDERGRASS; S. A.; KIM, D. Methods of integrating data to uncover genotype-phenotype interactions. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 2, p. 85–97, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrg3868>.

RODRIGUES NETO J.; MALAVOLTA JÚNIOR V.A.; VICTOR O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri Tipo B. **Suma Phytopathologica**, Botucatu, v.12, p.16, 1986.

RUAN, Y. L.; JIN, Y.; YANG, Y. J.; LI, G. J.; BOYER, J. S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. **Molecular Plant**, v. 3, n. 6, p. 942–955, 2010. <https://doi.org/10.1093/mp/ssq044>.

SALEEM, M. F. GHAFFAR, A.; ANJUM, S. A.; CHEEMA, M. A.; BILAL, M. F. Nitrogen effect on growth and yield of radish effect of nitrogen on growth and yield of radish. **Journal of agricultural research**, Florida and Louisiana Divisions, v. 48, n. 2, p. 219–225, 2012.

SANTOS, M. F. DOS.; MUNIZ DE PÁDUA, V. L.; MATOS NOGUEIRA, E. DE.; HEMERLY, A. S.; DOMONT, G. B. Proteome of *Gluconacetobacter diazotrophicus* co-cultivated with sugarcane plantlets. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 917–931, 2010. <<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.12.005>>.

SANTOS, R. L. DOS, FREIRE, F. J., DE OLIVEIRA, E. C. A., FREIRE, M. B. G. D. S., WEST, J. B., BARBOSA, J. DE A.; MOURA, M. J. A. DE.; BEZERRA, P. DA C. Nitrate reductase activity and nitrogen and biomass accumulation in sugarcane under molybdenum and nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 43, p. 1–19, 2019b. <<https://doi.org/10.1590/18069657rbcs20180171>>.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDAC, M. DEL C.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92–99, 2016. <[doi: 10.1016/j.micres.2015.11.008](https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008)>.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; OSBORNE, J.; THANGARAJU, M.; SA, T. M. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: Their possible role in plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 1, p. 130–140, 2008. <<https://doi.org/10.1007/s00248-007-9258-6>>.

SAS. **SAS Software**. Version 9.1. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 1999.

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. <<https://doi.org/10.1590/S0100-204X2012000200015>>.

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S. Produtividade e diluição isotópica de <sup>15</sup>N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016. <<https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000900059>>.

SHARMA, U.; BEKTUROVA, A.; VENTURA, Y.; SAGI, M. Sulfite oxidase activity level determines the sulfite toxicity effect in leaves and fruits of tomato plants. **Agronomy**, v. 10, n. 5, 2020. <<https://doi.org/10.3390/agronomy10050694>>.

SHIVALINGAMURTHY, S. G.; ANANGI, R.; KALAIPANDIAN, S.; GLASSOP, D.; KING, G. F.; RAE, A. L. Identification and functional characterization of sugarcane invertase inhibitor (ShINH1): A potential candidate for reducing pre- and post-harvest loss of sucrose in sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, n. May, p. 1–14, 2018. <<https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00598>>.

SHKOLNIK-INBAR, D.; BAR-ZVI, D. ABI4 Mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 22, n. 11, p. 3560–3573, 2010. <[doi:https://doi.org/10.1105/tpc.110.074641](https://doi.org/10.1105/tpc.110.074641)>.

SILVA, M. A. da. **Bactérias diazotróficas e adubação molíbdica na contribuição da fixação biológica de N<sub>2</sub> em cana planta**. 2016. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil, 2016.

SILVEIRA, A. P. D. DA.; SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; LABANCA, E. G.; CIPRIANO, M. A. P. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. **Applied Soil Ecology**, v. 107, p. 313–319, 2016. <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.005>>.

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.

STEPANSKY, A.; LEUSTEK, T. Histidine biosynthesis in plants. **Amino Acids**, v. 30, n. 2, p. 127–142, 2006. <[doi: 10.1007/s00726-005-0247-0](https://doi.org/10.1007/s00726-005-0247-0)>.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEXEIRA, K. R. S.; MARTINEZ- DRETS, G.; DÖBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 67–72, 1991. <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04323.x>>.

STITT, M.; KRAPP, A. The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: The physiological and molecular background. **Plant, Cell and Environment**, v. 22, n. 6, p. 583–621, 1999. <[doi: 10.1046/j.1365-3040.1999.00386.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1999.00386.x)>.

STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.; KRAPP, A. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 370, p. 959–970, 2002. <[doi: 10.1093/jexbot/53.370.959](https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.959)>.

STÜEKEN, E. E.; BUICK, R.; GUY, B. M.; KOEHLER, M. C. Isotopic evidence for biological nitrogen fixation by molybdenum-nitrogenase from 3.2 Gyr. **Nature**, v. 520, n. 7549, p. 666–669, 2015. <<https://doi.org/10.1038/nature14180>>.

SU, Y.; GUO, J.; LING, H.; CHEN, S.; WANG, S., XU, L.; ALLAN, A. C.; QUE, Y. Isolation of a Novel Peroxisomal Catalase Gene from Sugarcane, Which Is Responsive to Biotic and Abiotic Stresses. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2014. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084426>>.

TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K. Long-distance signaling in plant stress response. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 47, p. 106–111, 2019. <[doi: 10.1371/journal.pone.0084426](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084426)>.

TAVARES, E. Q. P.; GRANDIS, A.; LEMBKE, C. G.; SOUZA, G. M.; PURGATTO, E.; SOUZA, A. P. DE; BUCKERIDGE, M. S. Roles of auxin and ethylene in aerenchyma formation in sugarcane roots. **Plant Signaling and Behavior**, v. 13, n. 3, 2018. <<https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1422464>>.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. (Boletim Técnico, 5).

TEJADA-JIMENEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA, A.; CALATRAVA, V.; GALVAN, A.; FERNANDEZ, E.; LLAMAS, A. From the eukaryotic molybdenum cofactor biosynthesis to the moonlighting enzyme MARC. **Molecules**, v. 23, n. 12, 2018. <<https://doi.org/10.3390/molecules23123287>>.

TEJADA-JIMÉNEZ, M.; CHAMIZO-AMPUDIA, A.; GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E.; LLAMAS, Á. Molybdenum metabolism in plants. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1191–1203, 2013. <<https://doi.org/10.1039/c3mt00078h>>.

TEJADA-JIMÉNEZ, M.; GIL-DÍEZ, P.; LEÓN-MEDIAVILLA, J.; WEN, J.; MYSORE, K. S.; IMPERIAL, J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M. *Medicago truncatula* Molybdate Transporter type 1 (MtMOT1.3) is a plasma membrane molybdenum transporter required for nitrogenase activity in root nodules under molybdenum deficiency. **New Phytologist**, v. 216, n. 4, p. 1223–1235, 2017. <<https://doi.org/10.1111/nph.14739>>.

TERRA, L. A., DE SOARES, C. P., MENESES, C. H. S. G., TADRA SFEIR, M. Z., DE SOUZA, E. M., SILVEIRA, V.; VIDAL, M. S.; BALDANI, J. I.; SCHWAB, S. Transcriptome and proteome profiles of the diazotroph *Nitrospirillum amazonense* strain CBAmC in response to the sugarcane apoplast fluid. **Plant and Soil**, 2019. <<https://doi.org/10.1007/s11104-019-04201-y>>.

TIEN, T.; GASKINS, M.; HUBBELL, D. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 1016–1024, 1979. <[doi: 10.1128 / AEM.37.5.1016-1024.1979](https://doi.org/10.1128/AEM.37.5.1016-1024.1979)>.

VALE, D. W. do.; DE M. PRADO; R., AVALHÃES; C. C.; HOJO, R. H. Omissão de macronutrientes na nutrição o e no crescimento da cana-de-açúcar cultivada em solução nutritiva. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 6 n. 2, p. 189–196, 2011. <[doi:10.5039/agraria.v6i2a550](https://doi.org/10.5039/agraria.v6i2a550)>.

VANNINI, A.; CRAMER, P. Conservation between the RNA Polymerase I, II, and III Transcription Initiation Machineries. **Molecular Cell**, v. 45, n. 4, p. 439–446, 2012. <[doi: 10.1016/j.molcel.2012.01.023](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.023)>.

VOELCKEL, C.; GRUENHEIT, N.; LOCKHART, P. Evolutionary Transcriptomics and Proteomics: Insight into Plant Adaptation. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 6, p. 462–471, 2017. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.03.001>>.

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. <[doi: 10.1097/00010694-193401000-00003](https://doi.org/10.1097/00010694-193401000-00003)>.

WANG, J., KRIZOWSKI, S., FISCHER-SCHRADER, K., NIKS, D., TEJERO, J., SPARACINO-WATKINS, C.; WANG, L.; RAGIREDDY, V.; FRIZZELL, S.; KELLEY, E. E.; ZHANG, Y.; BASU, P.; HILLE, R. SCHWARZ, G.; GLADWIN, M. T. Sulfite Oxidase Catalyzes Single Electron Transfer at Molybdenum Domain to Reduce Nitrite to Nitric Oxide. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 4, p. 283–294, 2015. <<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5397>>.

WANG, J., KRIZOWSKI, S., FISCHER-SCHRADER, K., NIKS, D., TEJERO, J., SPARACINO-WATKINS, C.; SPARACINO-WATKINS, C.; WANG, L.; RAGIREDDY, V.; FRIZZELL, S.; KELLEY, E. E.; ZHANG, Y.; BASU, P.; HILLE, R.; SCHWARZ, G.; GLADWIN, M. T. Sulfite Oxidase Catalyzes Single-Electron Transfer at Molybdenum Domain to Reduce Nitrite to Nitric Oxide. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 23, n. 4, p. 283–294, 2015. <<https://doi.org/10.1089/ars.2013.5397>>.

WANG, L., ZHANG, F., RODE, S., CHIN, K. K., KO, E. E., KIM, J.; IYER, V. R.; QIAO, H. Ethylene induces combinatorial effects of histone H3 acetylation in gene expression in *Arabidopsis*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–13, 2017. <<https://doi.org/10.1186/s12864-017-3929-6>>.

XU, S.; HU, C.; TAN, Q.; QIN, S.; SUN, X. Subcellular distribution of molybdenum, ultrastructural and antioxidative responses in soybean seedlings under excess molybdenum stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, n. 1, p. 75–80, 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.11.023>>.

YAMASAKI, K.; KIGAWA, T.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YOKOYAMA, S. DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: Structure, function, and evolution. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 5, p. 267–276, 2013. <<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.09.001>>.

YIN, T. T.; PIN, U. L.; GHAZALI, A. H. A. Influence of external nitrogen on nitrogenase enzyme activity and auxin production in *Herbaspirillum seropedicae* (Z78). **Tropical Life Sciences Research**, Malásia, v. 26, n. 1, p. 101–110, 2015.

ZHANG, X. N.; SHI, Y.; POWERS, J. J.; GOWDA, N. B.; ZHANG, C.; IBRAHIM, H. M. M.; BALL, H. B.; CHEN, S. L.; LU, H.; MOUNT, S. M. Transcriptome analyses reveal SR45 to be a neutral splicing regulator and a suppressor of innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2017. <<https://doi.org/10.1186/s12864-017-4183-7>>.

ZHOU, J.; DENG, B.; ZHANG, Y.; COBB, A. B.; ZHANG, Z. Molybdate in rhizobial seed-coat formulations improves the production and nodulation of alfalfa. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2017. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170179>>.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

À proporção que a população mundial continua a crescer será imprescindível a melhoria da produtividade das culturas com finalidade de suprir a população em alimento e matéria-prima, e por este motivo, um conjunto de novas técnicas devem ser adotadas para fazê-lo de forma sustentável, com conseqüente redução dos custos de produção.

Neste cenário, é possível incluir o uso de BPCP como forma de elevar a produtividade da cultura e reduzir o uso de fertilizantes químicos, o que torna o cultivo mais ecologicamente responsável e com benefícios econômicos.

Em leguminosas, a utilização de inoculantes como alternativa de melhoria da adubação nitrogenada é realizada com sucesso, entretanto não apresentam resultados consistentes em culturas de espécies não leguminosas. Por este motivo, todas as pesquisas que utilizem técnicas de quantificação da FBN e que possam viabilizar a utilização desses inóculos na agricultura são fundamentais, principalmente no que se refere a cultura da cana-de-açúcar.

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 N via FBN, o que inviabiliza o uso.

A hipótese de que a aplicação do adubo molíbdico elevaria a FBN a ponto de suprir parcialmente a adubação nitrogenada foi refutada pois não foram observados incrementos significativos na quantidade de nitrogênio total a partir da FBN que pudessem suprir a necessidade da cultura.

Contudo, o Mo atuou em conjunto às bactérias diazotróficas estimulando o crescimento da parte aérea e raiz da planta e na contribuição da fonte N-fertilizante de forma significativa.

Além disso, a biomassa seca da parte aérea e raiz da cana-de-açúcar nos dois ciclos foram melhor desenvolvidos por estímulo de crescimento a partir da produção de fitohormônios vegetais, como as auxinas e ácido abscísico e também na melhoria do metabolismo de N. Esses resultados fornecem novas informações sobre o mecanismo molecular da cana-de-açúcar regulado pelo Mo e por BPCP. Nesta perspectiva, o conjunto atuou como bioestimulante e pode ser considerado uma alternativa potencial a redução do uso dos fertilizantes químicos que causam maior impacto ambiental.

Para todas as respostas aqui estudadas, a bactéria *Stenotrophomonas* sp. apresentou os melhores resultados podendo ser indicada como um possível inoculante futuro para os produtores quando associado ao Mo de forma a potencializar o crescimento e desenvolvimento da cultura da cana-de-açúcar.

Isso só pode ser alcançado com a compreensão total do sistema complexo planta-simbionte, e por isso se faz necessário a continuidade dos estudos sobre a contribuição da associação entre BPCP e Mo na cultura da cana-de-açúcar no campo, de forma que seja validada a eficiência da associação, bem como novos conhecimentos sejam gerados a partir dessa interação.