

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

AMANDA MICHELE SANTOS DE LIMA

**ADUBAÇÃO NITROGENADA E MOLÍBDICA EM CANA PLANTA
INOCULADA COM BACTÉRIA PROMOTORA DE CRESCIMENTO**

**RECIFE
2020**

Amanda Michele Santos de Lima
Engenheira Agrônoma

Adubação nitrogenada e molíbdica em cana planta inoculada com bactéria promotora de crescimento

Dissertação 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 Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Emídio Cantídio Almeida de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Renato Lemos dos Santos

Recife
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)

- L732a Lima, Amanda Michele Santos de
 Adubação nitrogenada e molíbdica em cana planta inoculada com bactéria promotora de crescimento / Amanda Michele Santos de Lima. - 2020.
 84 f. : il.
- Orientador: Emidio Cantidio
 Almeida de Oliveira. Coorientador:
 Renato Lemos dos Santos.
 Inclui referências e apêndice(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2020.
1. Cana-de-açúcar. 2. Fixação biológica. 3. Micronutriente. 4. Raiz. I. Oliveira, Emidio Cantidio Almeida de, orient. II. Santos, Renato Lemos dos, coorient. III. Título

CDD 631.4

AMANDA MICHELE SANTOS DE LIMA

Adubação nitrogenada e molíbdica em cana planta inoculada com bactéria promotora de crescimento

Dissertação 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 Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 10 de março de 2020.

ORIENTADOR

Prof. Dr. Emídio Cantídio Almeida de Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Rafael Otto
Universidade de São Paulo

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas
Universidade Federal Rural de Pernambuco

*Ao meu pai, **Edvaldo Lima**
À minha mãe, **Irani Freitas**
À minha irmã, **Andréia Carolina**
dedico e ofereço.*

AGRADECIMENTOS

À FACEPE e ao CNPq pelo custeio do projeto de pesquisa. Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

À UFRPE, um lugar acolhedor que vem sendo minha segunda casa ao longo de sete anos, durante a graduação e mestrado, e que me proporcionou aprendizado e oportunidades. Aos docentes e aos amigos que encontrei nessa casa.

À Yara Fertilizantes, na pessoa do Dr. Eduardo Saldanha e Eng^a Agrônoma Safira pelo fornecimento do fertilizante molíbdico e acompanhamento das avaliações experimentais.

À equipe do laboratório de biologia do solo do IPA pela parceria e colaboração para o preparo do inoculante. À Johny, Júnior e Marilene por me ensinarem, dividirem os dias de trabalho e pela torcida para que tudo desse certo. Em especial, agradeço ao Dr. José de Paula, sempre atencioso e prestativo, pelos ensinamentos, apoio e motivação.

À Jadson Antunes e Danúbia Lima, por me dedicar tempo para entender o projeto e compartilhar informações sobre o preparo do inoculante e inoculação na cana-de-açúcar. À Cacau, pelo feliz encontro antes de fazer a curva de crescimento da bactéria.

Ao laboratório de sementes do IPA, na pessoa do Dr. Nildo Tabosa, por ceder as sementes das plantas utilizadas como referência, e por ceder seu tempo para fornecer todas as informações de plantio e condução das plantas no campo.

À Miriri Alimentos e Bioenergia S/A por ceder área comercial e equipe de trabalho para a pesquisa. Ao Dr. Pedro, Gabriel, Gutemberg e Lourival pelo interesse na pesquisa e pela colaboração na idealização do projeto. Ao coordenador do laboratório de ATR, Severino Egídio, por conceder livre acesso ao laboratório. À equipe de campo, representada pelo técnico agrícola Antônio Emídio pela colaboração fundamental na condução experimental. Aos trabalhadores rurais com os quais dividi os dias de trabalho intenso;

Aos laboratórios da UFRPE (Biologia e Bioquímica do Solo, Biotecnologia Ambiental, Química do Solo, Química Ambiental, Anatomia e Bioquímica de Plantas), por cederem o espaço e equipamentos para realizar as análises, com todo apoio das suas equipes, muitas vezes em horários e dias incomuns. Em especial agradeço à Pedro Gabriel e Simone pela disponibilidade e paciência em conversar sobre e tirar todas as minhas dúvidas sobre as análises químicas.

Ao laboratório de Química e Fertilidade do Solo do IFPE – Vitória de Santo Antão, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Renato Santos pela disponibilidade e atenção. À Raul pela constante colaboração.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade e acolhimento. Aos professores pela dedicação, fundamental para processo de construção da minha formação! À Socorro pelo denço, pelos conselhos (e pelas broncas!). Ao coordenador Prof. Edivan pela dedicação, presença e por ser acessível. Que bom tê-lo como coordenador novamente!

Ao amigo Victor Lucas, pelas orientações na manipulação das bactérias e bom uso do laboratório de microbiologia. Pela estimada amizade herdada do nosso PET Agronomia; por ser ouvidos nos momentos mais difíceis, pelos abraços voluntários e involuntários. Por aceitar meu jeito exagerado com um sorriso. Pela paciência e tempo dedicados mesmo no crítico período pré-defesa de sua dissertação. A você meu carinho, admiração e gratidão.

Ao amigo Antônio Eduardo, por não permitir que eu me sentisse sozinha nesses dois anos. Uma verdadeira parceria construída com amizade e confiança. Companhia certa para virar a noite no laboratório, ficar até tarde preparando material e fazendo análises; passar três dias no campo (incluindo final de semana); chegar no campo as 4 horas da manhã e ficar até de madrugada processando amostras; dividir o trabalho pesado ou mesmo ficar com todo trabalho pesado. Eu não teria conseguido se você não tivesse escolhido me ajudar tanto.

Aos amigos Alan Silva e Alane Guimarães por colaborar nas minhas atividades e me ajudar a desligar delas em alguns momentos. Pelo compromisso em me fazer sorrir de algum jeito no meio do desespero que foi parte desses dois anos de mestrado. Como foi importante ter vocês!

À Clarissa pela amizade construída no compartilhar da rotina. Por cuidar de mim, se preocupar com meu almoço, meu emocional e deixar tão claro que quer me ver bem. Por cada abraço! Por ser minha consultora nas ciências do solo (você é brilhante!). Você foi um presente!

À Luan Wanderley pela feliz convivência no dia-a-dia. Por ouvir e frear meu excesso de palavras. Pelas palavras de incentivo, pelas críticas e por sempre me ensinar um pouco mais da Agronomia e Ciência do Solo.

Aos companheiros de curso Isamor, Gabriel, Valdo, Marcos e Luiz, pelas conversas científicas, divisão de responsabilidades, risadas e palavras de incentivo.

À Juliet Emília e Paula Renata pelas horas de conversa que trouxeram calma nos momentos de dúvida e emoções intensas.

Ao Grupo de Pesquisa em Nutrição de plantas, Adubação e Fertilidade do Solo - GNAF, alunos da graduação e pós-graduação, por serem apoio nas atividades, pelas risadas, torcida e amizade. Em especial a Magda, Luan, Abraão, Eduardo, Daniel Alencar, Henrique, Thiago, Pablo e Larissa. Obrigada pela colaboração e aprendizado juntos.

À professora Ana Dolores pela atenção e conversas sobre o meu trabalho, que foram importantes para a construção do conhecimento. Por me tranquilizar em vários momentos de exageros emocionais.

Ao Prof. Mario Lira Júnior, sempre disponível e paciente, ouvindo e tirando dúvidas, estimulando o pensamento crítico e científico. Por ser amigo, aconselhando e incentivando em cada conversa. Foi muito importante para minha formação encontrá-lo nessa etapa. Muito obrigada!

Ao Prof. Valdomiro pela atenção dedicada a mim, pelas críticas e conselhos. Cada palavra e seu olhar amigo serão sempre lembrados. Obrigada pelo acolhimento, pela orientação e tempo dedicado. A clareza, brilho nos olhos e prazer de compartilhar o conhecimento que vi na sua docência foram inspiradores.

Ao meu orientador Prof. Emídio Almeida, pelo fundamental apoio, apesar da rotina atarefada. Pela relação de confiança e por acreditar em mim mais do que eu mesma. Agradeço a orientação e direcionamento em cada etapa da pesquisa, por estar presente, pelos momentos de discussão que foram estímulo importante ao pensamento científico. Agradeço por investir tempo também no meu amadurecimento pessoal e profissional, com palavras sinceras, questionadoras e encorajadoras. Uma referência para mim de docência, com leveza, calma, bom humor e humildade. Agradeço pelos ensinamentos sobre a vida e sobre a Ciência do Solo. O senhor tem um papel importante na minha formação!

Às três pessoas mais importantes da minha vida, meus pais e minha irmã, por serem a expressão do amor, por termos uns aos outros.

Ter alguém é maravilhoso!

“Tu és, Jesus, amigo verdadeiro que tenho conhecido na vida dos meus irmãos.”

Adubação nitrogenada e molíbdica em cana planta inoculada com bactéria promotora de crescimento

RESUMO

O fertilizante nitrogenado apresenta baixo aproveitamento no primeiro ciclo da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). As bactérias promotoras de crescimento podem suprir parte do nitrogênio (N) exigido pela cultura por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN). O molibdênio (Mo) estimula a FBN, o que aumenta a disponibilidade de N, o crescimento e produtividade de colmos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a interação da adubação molíbdica (0 e 0,4 kg ha⁻¹) e nitrogenada (0 e 60 kg ha⁻¹) em conjunto com a inoculação de bactéria promotora de crescimento *Stenotrophomonas* sp. (sem e com) sobre a FBN e desenvolvimento das variedades RB867515 e RB92579 no ciclo de cana planta. O experimento foi conduzido em blocos e esquema fatorial 2x2x2, com quatro repetições. A cana planta foi avaliada aos 140 dias após o plantio (DAP) e ao final do ciclo de crescimento quanto aos fatores biométricos e nutricionais. A FBN foi medida pelo método de abundância natural de ¹⁵N, utilizando girassol e sorgo como plantas referências. A interação dos fatores N, Mo e inoculação não aumentou a FBN e não promoveu o crescimento da cana planta. O Mo aumentou o teor de N na folha +1, o N acumulado aos 140 DAP e o crescimento radicular nas duas variedades. A inoculação com a bactéria *Stenotrophomonas* sp. não aumentou a FBN, cuja contribuição média foi de 25%, independente do manejo. O Mo aumentou a FBN na RB867515 e não modificou o mecanismo na RB92579. A interação entre nitrogênio e inoculação aumentou a produção de biomassa aérea e crescimento em altura da RB92579. A adubação nitrogenada aumentou a altura, a produção de biomassa seca e de colmos, e a qualidade industrial da cana planta.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar. Fixação biológica. Micronutriente. Raiz.

Nitrogen and molybdenum fertilization in planted cane inoculated with plant promote-growth bacteria

ABSTRACT

Nitrogen fertilizer has low performance in the first cycle of sugarcane (*Saccharum* spp.). Plant promote-growth bacteria can supply part of nitrogen (N) demanded of plant through biological nitrogen fixation (BNF). Molybdenum (Mo) stimulates BNF, which increases N availability, stalk growth and productivity. This study aimed to evaluate the interaction of molybdenum (0 and 0.4 Kg ha⁻¹) and nitrogen (0 and 60 Kg ha⁻¹) fertilization together with the inoculation of plant promote-growth bacteria *Stenotrophomonas* sp. (without and with) on BNF and development of varieties RB867515 and RB92579 in the planted cane cycle. The experiment was carried out in randomized block design and in a 2x2x2 factorial scheme, with four replications. The biometric and nutritional variables of sugarcane was evaluated at 140 days after planting (DAP) and at the end of the growth cycle. BNF was quantified by the ¹⁵N natural abundance method, using sunflower and sorghum as reference plants. The interaction of factors N, Mo and inoculation did not increase BNF and did not promote the growth of planted cane. Mo increased nitrogen content on leaf +1 and above ground nitrogen content at 140 DAP, and the root biomass of sugarcane. Inoculation does not increase BNF whose average contribution of BNF in the planted cane was 25% regardless of management. Mo increased BNF on RB867515 but not modify it on RB92579. The interaction between nitrogen and inoculation increased biomass production and height of RB92579. Nitrogen fertilization increased height, biomass and stalk production, and the industrial quality of planted cane.

Keywords: Sugarcane. Biological fixation. Micronutrient. Root.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa do Estado da Paraíba, com destaque para o município de Rio Tinto, onde a área experimental foi implantada.....	26
Figura 2 - Precipitação pluviométrica (mm) e temperatura média (°C) mensal na área experimental durante o ciclo de cultivo, em Rio Tinto – PB.....	26
Figura 3 - Ilustração da unidade experimental com destaque para área útil subdividida em área de amostragem destrutiva (à esquerda) e não destrutiva (à direita).....	29
Figura 4 - Ilustração dos pontos de coleta de amostras de raiz em torno de uma touceira de cana-de-açúcar.....	34
Figura 5 - Nitrogênio acumulado (N total) e nitrogênio fixado da atmosfera (Nfix) nas variedades RB867515 e RB92579, aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	45
Figura 6 – Croqui da área experimental ilustrando o delineamento experimental e distribuição das variedades RB867515 (amarelo) e RB92579 (azul), e plantas referência sem (cinza) e com (preto) adubação nitrogenada.....	73
Figura 7 – Croqui da parcela das plantas utilizadas como referência.....	73
Figura 8 – Curva de crescimento bacteriano em meio de cultivo líquido de menor volume (a) e maior volume (b).....	74
Figura 9 – Etapas do preparo do inoculante turfoso.....	75
Figura 10 – Procedimento de inoculação da cana-de-açúcar em campo por imersão de rebolos.....	76
Figura 11 – Ilustração do procedimento de amostragem de raiz e separação do material radicular.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização química e física do solo da área experimental, em Rio Tinto – PB...	27
Tabela 2 - Teor de nitrogênio (N) e molibdênio (Mo), e atividade da enzima redutase do nitrato (ARN), avaliados na folha índice (+1) da cana planta (RB867515 e RB92579), aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	36
Tabela 3 - Extração de nitrogênio, abundância natural de ^{15}N e estimativa da FBN (%Ndda), na cana planta (RB867515 e RB92579), avaliados aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	41
Tabela 4 - Valores médios do $\delta^{15}\text{N}$ e estimativa da (%Ndda) na cana planta (RB867515 e RB92579), avaliados aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	43
Tabela 5 - Variáveis biométricas (altura, diâmetro do colmo e perfilhamento), da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliadas aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	47
Tabela 6 - Biomassa seca da parte aérea da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliada aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	48
Tabela 7 - Biomassa seca de raiz nas profundidades P1 (0 a 0,2 m) e P2 (0,2 a 0,4 m) da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliada aos 180 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	50
Tabela 8 - Variáveis biométricas (altura de planta, diâmetro do colmo, e massa seca total) da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliadas aos 340 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB.....	54
Tabela 9 - Produção de colmos (TCH) e produção de açúcar (TPH) da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliadas no final do ciclo, em Rio Tinto – PB.....	56
Tabela 10 - Atributos agroindustriais da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliados no final do ciclo, em Rio Tinto – PB.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Hipótese	22
1.2 Objetivo geral	22
1.3 Objetivos específicos	22
2 REVISAO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 A cana-de-açúcar e sua importância para agricultura brasileira	23
2.2 Nitrogênio na cana-de-açúcar	24
2.3 Molibdênio na cana-de-açúcar	26
2.4 Bactérias promotoras de crescimento e fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Descrição da área experimental	32
3.2 Condução experimental	34
3.3 Preparo do inoculante e inoculação	36
3.4 Cultivo de plantas referências	36
3.5 Coleta de dados e determinação das variáveis avaliadas	37
<i>3.5.1 Parâmetros morfofisiológicos</i>	37
<i>3.5.2 Análise nutricional</i>	38
<i>3.5.3 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico</i>	38
<i>3.5.4 Atividade da enzima redutase do nitrato</i>	39
<i>3.5.5 Biomassa radicular</i>	39
3.6 Análise estatística	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Teor de nitrogênio na folha +1	41
4.2 Teor de molibdênio na folha +1	43
4.3 Atividade da enzima redutase do nitrato	45
4.4 Acúmulo de nitrogênio na parte aérea	46
4.5 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio	48
4.6 Parâmetros morfofisiológicos - 140 DAP	52

4.7 Biomassa radicular – 180 DAP	55
4.8 Parâmetros morfofisiológicos – 340 DAP	59
4.9 Produtividade e atributos agroindustriais	61
5 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICE A – Croqui da área experimental	80
APÊNDICE B – Elaboração da curva de crescimento bacteriano	81
APÊNDICE C – Preparo do inoculante	82
APÊNDICE D – Inoculação da cana-de-açúcar em campo	83
APÊNDICE E – Coleta e processamento de amostras de raiz	84

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar ocupa o primeiro lugar entre as commodities mais produzidas do Brasil, e é o recurso renovável de maior representatividade na matriz energética nacional. A demanda mundial por biocombustíveis na década de 70, impulsionou o desenvolvimento econômico e tecnológico da cultura no Brasil. Atualmente o país é o segundo maior produtor de etanol de cana-de-açúcar do mundo. Por meio do Renovabio, o governo brasileiro estimula o setor sucroenergético com o objetivo de reduzir as emissões de CO₂ no país.

Diante da demanda por fontes energéticas menos poluentes que o petróleo e sistema de produção sustentável, a cana-de-açúcar tem vantagem competitiva, pelo balanço energético alto. O metabolismo C₄ da cultura promove maior conversão do CO₂ e de insumos (como água e nutrientes) em biomassa, superando o rendimento em biocombustível de culturas como milho e trigo. A produção de biomassa na cana-de-açúcar tem alta correlação com o acúmulo de nitrogênio (N) nas plantas, um nutriente limitante nos solos tropicais. O manejo do N é feito via fertilizante, e passa por várias transformações no solo, podendo ser perdido no sistema ou retido na matéria orgânica do solo. Dessa forma, o aproveitamento do fertilizante pelas plantas é baixo, não ultrapassando 20% no ciclo de cana planta, o que compromete o balanço energético e o rendimento econômico da cultura.

Nesse cenário, a inoculação de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) é uma alternativa sustentável para o manejo do N na cana-de-açúcar durante o primeiro ciclo. Essas bactérias realizam mecanismos benéficos com efeito direto e indireto sobre o desenvolvimento das plantas. Por meio da FBN, a contribuição do ar para a nutrição nitrogenada da planta pode reduzir o consumo de fertilizante. Assim como a solubilização de nutrientes e produção de hormônios vegetais pelas bactérias podem promover o crescimento do sistema radicular, aumentando o aproveitamento do N-fertilizante.

Em solos com baixo teor de matéria orgânica, a deficiência de N cria condição favorável à FBN. Na presença de Mo esse mecanismo torna-se mais eficiente, aumentando sua contribuição para a planta, e há estímulo à produção de fitohormônios. A ação conjunta desses mecanismos promove o desenvolvimento das plantas, mas podem ser limitados por fatores ambientais bióticos e abióticos, como temperatura, umidade, disponibilidade de nutrientes no solo, e genótipo da planta utilizada. O manejo desses micro-organismos deve considerar tais fatores, selecionando bactérias eficientes, variedades que respondam à inoculação, e condição ambiental favorável aos mecanismos de interesse.

Nas plantas, o Mo é essencial para metabolismo do nitrato, possibilitando o aproveitamento dessa forma de nitrogênio absorvida do solo. As variedades de cana-de-açúcar diferem quanto à preferência pelas formas de N (nitrato e amônio), podendo haver reação diferente das variedades à aplicação de Mo. De semelhante modo, a inoculação de BPCP pode ter efeitos diferenciados entre as variedades, disponibilizando diretamente N-amoniaco em meio deficiente de N.

A adição de N em quantidade que não supre a necessidade da cultura possibilita a manutenção da fixação, e favorece o crescimento da comunidade microbiana rizosférica, e intensifica a realização dos mecanismos benéficos às plantas. Assim, a combinação da inoculação de BPCP, adubação molíbdica e de dose baixa de N pode intensificar a realização dos mecanismos benéficos às plantas e promover maior crescimento da cana planta.

1.1 Hipótese

A combinação da adubação molíbdica e nitrogenada na cana-de-açúcar inoculada com bactéria promotora de crescimento, aumenta a contribuição do N_2 e estimula o crescimento e produtividade de colmos na cana planta.

1.2 Objetivo geral

Identificar se a adubação molíbdica associada à adubação nitrogenada na cana-de-açúcar inoculada com BPCP aumenta a fixação biológica de nitrogênio, o crescimento e produtividade da cana planta.

1.3 Objetivos específicos

- Avaliar no ciclo de cana planta a contribuição do molibdênio, nitrogênio e da inoculação de bactéria promotora de crescimento (BPCP) na fixação biológica de nitrogênio em duas variedades de cana-de-açúcar;
- Avaliar a nutrição nitrogenada na cana planta inoculada com BPCP, adubada com molibdênio e nitrogênio;
- Avaliar o desenvolvimento da parte aérea e radicular da cana planta inoculada com BPCP, adubada com molibdênio e nitrogênio;
- Avaliar o efeito da inoculação com BPCP associada à adubação molíbdica e nitrogenada na produtividade de colmos e qualidade industrial de duas variedades de cana-de-açúcar no ciclo de cana planta.

2 REVISAO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cana-de-açúcar e sua importância para agricultura brasileira

A exploração comercial da cana-de-açúcar é realizada desde o Brasil Colonial, e por muito tempo o valor da cultura esteve centralizado na produção de açúcar. A partir do século XX, a produção de etanol derivado da cana-de-açúcar ganhou importância pela demanda por fontes alternativas de energia diante da crise internacional do petróleo (LEAL; WALTER; SEABRA, 2013). Nesse período, o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Álcool - ProÁlcool e impulsionou a produção da cultura no país, movimentando a economia e gerando empregos e renda para as comunidades locais e regionais (MORAES; BACHI; CALDARELLI, 2016; OLIVEIRA, 2002).

A expansão da área cultivada e diversificação da cadeia produtiva da cana-de-açúcar foram acompanhadas pelo emprego de tecnologias agroindustriais. O melhoramento genético de plantas foi uma importante ferramenta, desenvolvendo variedades mais produtivas, com melhor desempenho industrial e adaptadas às diferentes condições edafoclimáticas do Brasil (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009). Atualmente, a cana-de-açúcar é a commodity agrícola mais produzida e terceira mais exportada no país (FAO, 2017). A produção se concentra na região Sudeste, e o Estado de São Paulo é responsável por 53,7% da produção nacional. Na região Nordeste, o Estado de Alagoas é o maior produtor, seguido pelos Estados de Pernambuco e Paraíba (CONAB, 2019).

A busca pela substituição de combustíveis fósseis por fontes energéticas menos poluentes promoveu o uso de biomassa para produção de biocombustíveis, como etanol e biodiesel, utilizando culturas graníferas, oleaginosas e açucareiras (KOÇAR; CIVAS, 2013). A cana-de-açúcar é uma cultura açucareira de metabolismo C₄, caracterizado pela conversão eficiente do CO₂ em biomassa, e acúmulo de açúcar. Essa característica confere alto potencial produtivo, aumentando o rendimento de etanol por área (LEAL; WALTER; SEABRA, 2013; SILVA, 2017b).

O balanço energético do etanol da cana-de-açúcar é positivo e superior ao etanol de milho, sorgo e trigo, isso se deve à maior captura de CO₂ na área agrícola de cana-de-açúcar e ao menor consumo de água por litro de etanol produzido pela cultura (BORDONAL et al., 2018; SEABRA et al., 2011). O revolvimento do solo em intervalos mínimos de cinco anos e a mudança da despalha a fogo para colheita de cana crua reduzem as emissões de CO₂ e melhoram a qualidade do solo (CAPAZ; CARVALHO; NOGUEIRA, 2013; SOUSA JUNIOR et al., 2018). Tais características associadas ao aproveitamento dos subprodutos da industrialização

para diversos fins, reduzem o impacto ambiental da cultura, que mantém alto balanço energético.

A cana-de-açúcar é recurso renovável de maior representatividade na matriz energética nacional (BRASIL, 2018) e, recentemente, o governo brasileiro criou a Política Nacional de Biocombustíveis - RenovaBio, para aumentar a participação de bioenergia na matriz. Essa Política é uma estratégia para o cumprimento do Acordo do Clima de Paris, e incentiva o crescimento da produção de etanol de cana-de-açúcar com mais tecnologia e sustentabilidade. O uso da palha para a produção de etanol aumenta o rendimento da cultura e pode reduzir a necessidade de expansão da área plantada (GRASSI; PEREIRA, 2019). Dessa forma, a produção nacional que hoje é responsável por 40% do etanol no mercado mundial, é uma importante aliada para redução das emissões de GEE nacional e internacionalmente (CALDARELLI; GILIO, 2018).

O consumo elevado de fertilizantes nitrogenados no manejo da cana-de-açúcar é ainda uma questão crítica para a sustentabilidade da produção. Apesar de a dose média utilizada no Brasil (cerca de 100 kg ha⁻¹) ser inferior à aplicada em outros países do mundo, há baixo aproveitamento do fertilizante no campo (FRANCO et al., 2011; ROBINSON et al., 2011). O N-fertilizante não aproveitado pelas plantas passa por transformações e perdas no sistema. Uma das perdas decorre da emissão de óxido nitroso (N₂O), um gás de efeito estufa (GEE). Na cana, essa perda é estimada em 1,8%, e compromete o balanço das emissões de GEE da cultura por ser um gás de potencial de aquecimento superior ao do CO₂ (OTTO et al., 2016). Tendo em vista que o Brasil é o maior produtor mundial da cultura (FAO, 2017), medidas que aumentam o aproveitamento do N-fertilizante pela planta são estudadas, a fim de minimizar os impactos ambientais e econômicos da produção (GONZAGA et al., 2018; OTTO et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

2.2 Nitrogênio na cana-de-açúcar

O nitrogênio (N) é um macronutriente que tem papel constitutivo nos compostos de carbono, como clorofila, enzimas e ácidos nucleicos, e regula processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no crescimento e expressão de genes (TAIZ et al., 2017; BOUGUYON; GOJON; NACRY, 2012; SOUZA; FERNANDES, 2018). Na cana-de-açúcar é o nutriente mais correlacionado com a produção de biomassa (VALE et al., 2011).

As principais formas de N absorvidas pelas plantas são nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺). Entre as variedades de cana-de-açúcar pode haver preferência de absorção, no entanto, ambas são absorvidas, sobretudo em ambientes com disponibilidade limitada de uma delas (SANTOS

et al., 2019a; ROBINSON et al., 2011). Como as plantas não assimilam o N em alto estado de oxidação, o nitrato absorvido precisa ser reduzido a amônio. Isso ocorre por meio da ação das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, e envolve custo energético alto para a planta (SOUZA; FERNANDES, 2018). O amônio absorvido diretamente do solo ou gerado pela transformação do nitrato pode ser armazenado ou incorporado a moléculas de carbono nas raízes ou nas folhas. A principal via de incorporação se dá por meio das enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase, formando os aminoácidos glutamina e glutamato, respectivamente (via GS-GOGAT), dando sequência à formação de moléculas orgânicas (TISCHNER, 2000).

O nitrogênio absorvido pela planta é oriundo da solubilização de fertilizantes nitrogenados, ou por meio de transformações realizadas pelos micro-organismos edáficos, como mineralização, fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) e nitrificação. A mineralização e a FBN disponibilizam N-amoniaco. O íon amônio que não é absorvido pelas plantas é transformado em nitrato por meio da nitrificação. Esse processo consiste na oxidação do amônio a nitrito (nitritação), e do nitrito a nitrato (nitratação), e ocorre de forma intensa e rápida em solos aerados (INSELBACHER et al., 2013; TAIZ et al., 2017).

A atividade dos micro-organismos depende das condições do ambiente e do solo, como quantidade de substrato orgânico, nutrientes, aeração e temperatura (KUZYAKOV, 2010). O tipo de solo e a oscilação das condições ambientais no sistema de produção da cana-de-açúcar ao longo dos ciclos e dentro do mesmo ciclo, interferem na atividade microbiana. Isso torna as medições de contribuição variáveis e de difícil reprodução de resultados obtidos entre ambientes e ciclos (FRANCO et al., 2010). As variedades também são fator de variação, apresentando diferentes respostas em estudos da FBN (PEREIRA et al., 2013; SCHULTZ et al., 2012; 2014).

A adubação nitrogenada na cana-de-açúcar mantém correlação entre dose aplicada e conversão em biomassa, no entanto, ao longo dos ciclos o aproveitamento do fertilizante é variável (FRANCO et al., 2010). Segundo Franco et al. (2011), no primeiro ciclo cerca de 30% do nitrogênio da planta é derivado do fertilizante, e outras fontes têm maior contribuição, como a mineralização da matéria orgânica oriunda dos resíduos vegetais da socaria que é intensificada pelo revolvimento do solo (OLIVEIRA et al., 2010; TRIVELIN et al., 2002). A reserva do colmo semente, a fixação biológica de nitrogênio e o vigor do sistema radicular da cana planta também são citados como fontes de N para o primeiro ciclo (JADOSKI, 2010).

Nos ciclos subsequentes, não há mobilização do solo e o estoque de material orgânico é reduzido a cada ano, então o fertilizante passa a ser a principal fonte de N para as plantas (FRANCO et al., 2011). A porção não aproveitada pela planta é perdida por imobilização,

lixiviação, volatilização e desnitrificação. A média de perda por esses mecanismos na cana-de-açúcar são estimadas em 32%, 5,6%, 19% e 1,8%, respectivamente, sendo aproveitados apenas 26% do fertilizante. De acordo com o ambiente, fonte fertilizante e forma de aplicação, as perdas podem ser maiores ou menores e comprometerem o balanço energético da cultura (OTTO et al., 2016).

A interação com outros nutrientes de efeito sinérgico com o nitrogênio pode aumentar a eficiência de uso do fertilizante, como o enxofre (BROWN et al., 2000), fósforo (IQBAL; IQBAL, 2001), e molibdênio (OLIVEIRA, 2012). Esses nutrientes podem aumentar a assimilação do N disponível no solo, e gerar produtividade semelhante à de doses altas de N (VIEIRA, 2015). No ciclo de cana planta busca-se explorar as outras fontes que são responsáveis por mais de 70% do N presente na planta. O uso de culturas leguminosas intercalares, assim como a exploração da interação planta-bactéria, tem potencial de redução da dose fertilizante nitrogenado por meio da fixação biológica de nitrogênio (PEREIRA et al., 2018; LUO et al., 2016). Tais medidas são estratégias de manejo da adubação nitrogenada, reduzindo custo ambiental e econômico da produção.

2.3 Molibdênio na cana-de-açúcar

O molibdênio (Mo) é o nutriente menos abundante na crosta terrestre e o micronutriente menos exigido pelas culturas. A forma absorvida pelas plantas é o ânion molibdato (MoO_4^{2-}), cuja absorção é proporcional à disponibilidade no solo. Como está presente no solo em baixas concentrações, o molibdato é captado por meio de transportadores de alta afinidade, que funcionam como sensores para aumentar a eficiência da absorção. O Mo é disponibilizado no solo em pH acima de 5,0 e os íons absorvidos em excesso são armazenados em vacúolos, assim a deficiência e a toxidez de Mo são raras em cultivos agrícolas. Sua função nos organismos é de ativador de enzimas envolvidas em reações de oxido-redução (transferases), formando o molibdênio cofator (HAMLIN, 2007; TEJADA-JIMÉNEZ et al., 2013).

O molibdênio está presente no sítio ativo da enzima nitrogenase em micro-organismos procariotos capazes de fixar nitrogênio atmosférico e disponibilizá-lo no ambiente. Entre os elementos de transição que podem ocupar o sítio ativo, o Mo realiza a reação com menor custo energético para a célula, regulando a taxa de fixação e o ciclo de N no sistema (GUHA; PHUKAN, 2011). A adubação molíbdica é uma forma de aumentar a atividade da enzima e a quantidade de nitrogênio disponibilizado por meio da fixação (MA et al., 2019; SANTOS et al., 2019b).

Várias enzimas de molibdênio estão presentes em bactérias promotoras de crescimento de plantas. Como exemplo, a aldeído oxidase atua na síntese de ácido indol-acético (AIA) em bactérias associativas, beneficiando o crescimento vegetal por meio da atuação desse fitohormônio (MENDEL, 2011). Dessas enzimas, cinco podem ser encontradas também nas plantas: nitrato redutase (RN), sulfito oxidase, xantina desidrogenase, aldeído oxidase e amidoxima redutase mitocondrial. Essas enzimas regulam o metabolismo do carbono, enxofre e nitrogênio, e a síntese de hormônios reguladores de crescimento. Tanto a deficiência quanto a toxidez de Mo podem resultar em falhas na fotossíntese e no uso de carboidratos (MENDEL, 2011; TISCHNER, 2000).

A maior parte do Mo das plantas encontra-se na redutase do nitrato (RN). Em plantas de metabolismo C₄, como a cana-de-açúcar, está localizada em células especializadas da bainha vascular (SOUZA; FERNANDES, 2018). É a primeira enzima para assimilação do nitrato, e se torna essencial para assimilação de N em solos tropicais, nos quais o nitrato é a principal fonte de N. A absorção de nitrato induz a atividade da RN (ARN), no entanto, a ativação da enzima acontece somente na presença de molibdato. Quando há deficiência de Mo, as plantas acumulam nitrato nos tecidos e podem apresentar deficiência de N (KAISER et al., 2005; LI-PING; YANG-RUI; LI-TAO, 2007).

Na cana-de-açúcar, o nível crítico de Mo é de 0,15 a 0,30 mg kg⁻¹ (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). A adubação molíbdica aumenta o acúmulo de nitrogênio (SANTOS et al., 2019a) pelo aproveitamento do nitrato do solo por meio da ARN. A intensidade de resposta da ARN pode variar entre variedades e durante o ciclo da cultura, em resposta à dose de Mo e conteúdo interno de amônio e aminoácidos (LI-PING; YANG-RUI; LI-TAO, 2007).

O manejo adequado do nutriente está associado a ganhos de produtividade na cana-de-açúcar, como verificado por Becari (2010), Oliveira (2012) e Vieira (2015). Doses altas de Mo podem reduzir a ARN e a atividade da GS-GOGAT, e reduzir a produtividade da cana-de-açúcar (LI-PING; YANG-RUI; LI-TAO, 2007; VIEIRA, 2015). A dose adequada de molibdênio pode variar de acordo a condição do solo e forma de aplicação. A aplicação via solo resulta em ganhos com doses menores, no entanto, a aplicação via foliar pode ser uma alternativa em solos com alta capacidade de fixação do Mo (BECARI, 2010; VIEIRA, 2015).

2.4 Bactérias promotoras de crescimento e fixação biológica de nitrogênio na cana-de-açúcar

No ar atmosférico o nitrogênio é abundante, mas se encontra na forma molecular (N₂) em que dois átomos de N são unidos por uma ligação tripla. Nessa forma, o nitrogênio não pode

ser aproveitado pelos organismos, sendo necessária a conversão em formas reativas, como nitrato e amônio. Somente um grupo de micro-organismos especializados (diazotróficos) são capazes de realizar essa transformação, por meio do mecanismo de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Os diazotróficos são fundamentais para o equilíbrio dos ecossistemas naturais, recuperando parte do nitrogênio perdido durante a ciclagem do nutriente (FOWLER et al., 2013; REIS et al., 2016).

Na FBN a ligação tripla é rompida e o N_2 é convertido em amônia (NH_3), que é facilmente oxidada em íon amônio. A reação é catalisada pelo complexo enzimático nitrogenase, composto por quatro subunidades peptídicas, e um cofator com elemento metálico. O cofator é responsável por reunir a energia necessária para quebra da ligação tripla, e pode ser ocupado por molibdênio (Mo), vanádio (V) ou ferro (Fe). Apesar de natural, a conversão tem custo energético alto para a célula microbiana, e a Mo-nitrogenase apresenta alta especificidade de substrato e eficiência energética, utilizando 16 moléculas de ATP para formação de duas moléculas de amônia. As nitrogenases de V e Fe apresentam menor especificidade de substrato e maior consumo de ATP, e por isso são sintetizadas na ausência de Mo (BOYD; HAMILTON; PETERS, 2011; GUHA; PHUKAN, 2011). A atuação diferenciada dessas nitrogenases podem ter impacto na estimativa da FBN, de acordo com o método utilizado e com a forma predominante no ambiente estudado (ZHANG et al., 2016).

Na cana-de-açúcar a FBN ganhou importância com a descoberta de que bactérias diazotróficas se associam à cultura, beneficiando seu crescimento (DOBEREINER, 1992). Posteriormente foram identificadas bactérias diazotróficas colonizando a rizosfera e os tecidos internos e externos da cana-de-açúcar (LIMA et al., 2018; SILVA et al., 2016). A possibilidade de produção com menor consumo de fertilizante despertou o interesse na interação cana-bactéria pela alta demanda da cana-de-açúcar por nitrogênio. Nesse sentido, buscou-se identificar e selecionar micro-organismos com alta atividade fixadora (BALDANI et al., 1997).

A estimativa da contribuição da FBN em gramíneas pode chegar a $75 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N, que é bastante inferior à média obtida para interação simbiótica em plantas leguminosas ($180 \text{ kg ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ de N). No entanto, pode reduzir significativamente o consumo de fertilizantes nitrogenados, o que implica em redução do custo de produção e dos danos ambientais da produção e do uso do insumo (REIS et al., 2018). Isso porque a produção dos fertilizantes nitrogenados consiste na quebra da ligação tripla da molécula de N_2 atmosférico, sob temperatura e pressão elevadas (fixação industrial - processo Habber-Boch), utilizando energia derivada de combustível fóssil. No campo, as perdas de N do fertilizante podem resultar na

emissão de gases de efeito estufa (GEE) e/ou provocar eutrofização de corpos hídricos (BODDEY, 1995; OTTO et al., 2016; REIS et al., 2018).

O estabelecimento das interações associativas com não leguminosas ainda não é bem compreendido (PANKIEVICZ et al., 2015). No Brasil, atribui-se às associações planta-bactéria o bom desempenho das variedades em ambientes limitantes. O cultivo sucessivo com fins comerciais e de melhoramento genético, em solos de baixa fertilidade e com baixas doses de N, selecionou interações eficientes entre bactérias diazotróficas e as variedades cultivadas no país. Como resultado, as lavouras brasileiras de cana-de-açúcar realizam o manejo de N com dose média inferior a 100 kg ha^{-1} , enquanto em outros países com produtividade semelhante a dose média é de 200 kg ha^{-1} (BALDANI et al., 2002; ROBINSON et al., 2011).

A contribuição da FBN no Brasil para a cana-de-açúcar varia de acordo com o genótipo da planta hospedeira e da estirpe bacteriana, e a fase do desenvolvimento de ambos (LIMA et al., 2018; TAULÉ et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). Fatores abióticos como disponibilidade de carbono, umidade e pH do solo influenciam a atividade microbiana e, conseqüentemente, a ocorrência dos mecanismos benéficos de interesse. Diante disso, as bactérias associativas endofíticas são preferíveis, visto que nos espaços intercelulares encontram um ambiente rico e protegido das oscilações ambientais que podem reduzir a eficiência da interação (BALDANI et al., 1997).

A técnica de avaliação da ocorrência de FBN é um outro fator de variação da estimativa de FBN. São utilizadas a redução do acetileno, que mede a atividade da enzima nitrogenase; o balanço de nitrogênio, que identifica e quantifica as fontes de N para o sistema em estudo; e as técnicas isotópicas, que utilizam a composição de isótopos estáveis de nitrogênio (^{14}N e ^{15}N) do ar, do solo ou de fertilizantes minerais enriquecidos artificialmente. Cada uma apresenta vantagens e desvantagens quanto à precisão, tempo de análise e custo (UNKOVICH et al., 2008; REIS et al., 2018). As técnicas isotópicas têm maior precisão, e envolvem a utilização de plantas referência não fixadoras com fenologia, desenvolvimento radicular e marcha de absorção de nutrientes semelhantes ao da planta fixadora. Em estudos com cana-de-açúcar a definição da planta referência é um fator crítico diante da dificuldade de identificar planta não fixadora que atenda esses requisitos. Para obter estimativas mais precisas deve-se utilizar várias plantas como referência (BODDEY et al., 2001).

Para a cana-de-açúcar as contribuições variam de zero a 60% do nitrogênio atmosférico, de acordo com a variedade, condições ambientais, fase fenológica avaliada e inoculação (BODDEY et al., 2001; SCHULTZ et al., 2014; SILVA, 2017a; SANTOS et al., 2019b;

URQUIAGA 2012; CARVALHO et al., 2017). Apesar de variáveis, os resultados demonstram contribuição média 15% a 20%.

Os fatores ambiente e genótipo dificultam a compreensão do real potencial de contribuição do mecanismo para a cultura no Brasil, pela diversidade de variedades de cana-de-açúcar e das condições edafoclimáticas das regiões produtoras (HOGBERG, 1997; SCHULTZ et al., 2016; 2017). No entanto, mesmo que não haja substituição total da adubação nitrogenada, há potencial uso da inoculação como complemento à fertilização mineral (GOSAL et al., 2012; OLIVER; SILVA, 2018; PEREIRA et al., 2018; SCHULTZ et al., 2014).

As bactérias diazotróficas realizam vários mecanismos que beneficiam de forma direta e indireta o desenvolvimento dos vegetais, por isso são chamadas de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) (MEHMOOD et al., 2018). Além de fixar nitrogênio, podem produzir de hormônios vegetais, solubilizar nutrientes, e inibir a ação de patógenos (ANTUNES et al., 2017; SILVA, et al., 2015). O uso de inoculantes de BPCPs na cana-de-açúcar mostram resultados comparáveis ao de plantas adubadas somente com nitrogênio mineral, e mesmo que não seja identificada a FBN, outros mecanismos são apontados como promotores do crescimento (SCHULTZ et al., 2014). A modificação da arquitetura radicular observada nos estudos é um fator importante de incremento da assimilação de nutrientes, resultando em maior produtividade (GÍRIO et al., 2015; LIMA et al., 2018; PEREIRA et al., 2018). A atual discussão sobre a FBN em gramíneas questiona se a fixação biológica ou outros mecanismos contribuem para a promoção de crescimento verificada em plantas inoculadas (SCHULTZ et al., 2017).

A ação conjunta dos mecanismos de promoção do crescimento pode alterar o comportamento morfofisiológico das plantas, e alterar os resultados utilizados para estimar a contribuição da fixação de nitrogênio (MARCOS et al., 2015). Na técnica de abundância natural do isótopo ^{15}N , a diluição do isótopo pesado (^{15}N) na planta é interpretada como ocorrência da fixação, pela captação e disponibilização do ^{14}N da atmosfera pelos diazotróficos. No entanto, a dinâmica do N é diferente entre os isótopos (HOGBERG, 1997), e o isótopo leve (^{14}N) é mais suscetível à redistribuição e perdas na planta, via senescência de folhas e volatilização (TRIVELIN et al., 2002). Por tais fenômenos, a planta pode se tornar enriquecida no isótopo mais pesado, e a contribuição da fixação medida pela diluição isotópica ao final do ciclo pode ser subestimada. Como essa metodologia permite avaliar as culturas ao longo de todo ciclo, é possível identificar fases de maior contribuição da fixação (UNKOVICH et al., 2008). Silva (2016) e Taulé et al (2011) identificaram contribuição da FBN nas fases iniciais do desenvolvimento, quando a demanda por nitrogênio pelas plantas é maior.

As variedades mostram diferentes comportamentos quanto à ocorrência de FBN e resposta à inoculação bacteriana (PEREIRA et al., 2013; SCHULTZ et al., 2012; 2014; 2017). O mesmo ocorre para a resposta à adubação nitrogenada. Esse comportamento é resultado da influência genética sobre o metabolismo do N e eficiência de utilização do nutriente para produção de biomassa (OLIVEIRA et al., 2010; 2016). Além disso, as comunidades microbianas associadas às variedades podem diferir em estrutura e função (LIMA et al., 2018; TAULÉ et al., 2011; SOUZA ANTONIO, 2016).

A seleção de estirpes bacterianas e variedades de cana-de-açúcar podem aumentar a eficiência de uso do fertilizante nitrogenado e permitir a redução da dose sem prejuízo da produção (PEREIRA et al., 2018). Identificar práticas que favorecem a FBN e outros mecanismos benéficos, é necessário para aumentar os benefícios da associação bactéria e cana-de-açúcar. Em busca de um sistema de manejo mais sustentável, a redução do consumo de N é uma estratégia importante para reduzir o custo ambiental da produção, elevando ainda mais o balanço energético da cultura (BODDEY et al., 2003; REIS et al., 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da área experimental

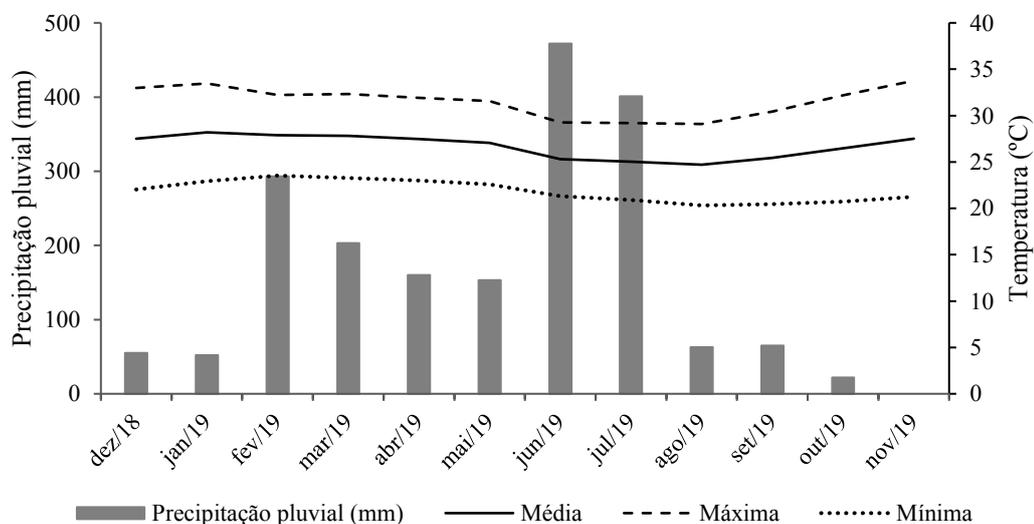
O experimento foi conduzido em campo entre dezembro de 2018 a novembro de 2019, na área agrícola da Miriri Alimentos e Bioenergia, no município de Rio Tinto, no Estado da Paraíba, com localização geográfica $6^{\circ}49'58,8''$ S e $34^{\circ}57'24''$ W (Figura 1). O município está localizado mesorregião Zona da Mata Paraibana, e microrregião Litoral Norte (AESA, 2020). Segundo a classificação de Koppen, a região está inserida na zona climática As, com chuvas de inverno. A precipitação e temperatura anual média são de 1.500 mm e 26°C , respectivamente (ALVARES et al., 2013).

Figura 1 – Mapa do Estado da Paraíba, com destaque para o município de Rio Tinto



Fonte: Adaptado de IBGE (2020).

Figura 2 – Precipitação pluviométrica (mm) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) mensais na área experimental durante o ciclo de cultivo, em Rio Tinto – PB



Fonte: Dados obtidos de estação agrometeorológica da Miriri Alimentos e Bioenergia S/A.

O solo da área experimental é classificado como Argissolo Amarelo distrocoeso (PAdx), de textura arenosa (EMBRAPA, 2018). Durante o ciclo, a precipitação pluvial foi de 1.912 mm, com temperatura mínima de 18°C e máxima de 35°C (Figura 2). No primeiro mês após o plantio foi aplicada lâmina de 27 mm de água, via pivô central.

O preparo do solo foi realizado de forma mecanizada pela Miriri Alimentos e Bioenergia S/A, envolvendo operações de subsolagem, calagem e gradagem. A dose de calcário foi determinada pelo método de saturação de bases a 70%, sendo aplicados 2 Mg ha⁻¹ de calcário à lanço, incorporado ao solo a 0,3 m de profundidade, 50 dias antes do plantio. A sulcagem foi feita a 0,3 m de profundidade.

Após o preparo, o solo foi coletado nas profundidades 0 a 0,2 m e 0,2 a 0,4 m para caracterização química e física (Tabela 1). Foram coletadas 12 amostras simples para formar uma amostra composta para cada profundidade. A análise do solo seguiu a metodologia proposta pela EMBRAPA (2017).

Tabela 1 - Caracterização química e física do solo da área experimental, em Rio Tinto – PB

Atributo	Profundidade	
	0 - 0,20 m	0,20 - 0,40 m
pH _{H2O} (1:2,5)	6,30	6,20
Ca ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	1,30	1,10
Mg ²⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,70	0,40
K ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,04	0,03
Na ⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,03	0,02
Al ³⁺ (cmol _c dm ⁻³)	0,00	0,00
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	1,30	1,30
CTC _{efetiva} (cmol _c dm ⁻³)	2,07	1,55
CTC _{potencial} (cmol _c dm ⁻³)	3,37	2,85
V (%)	61,44	54,40
m (%)	0,00	0,00
COT (g kg ⁻¹)	5,50	5,00
P (mg dm ⁻³)	7,00	7,00
Fe ²⁺ (mg dm ⁻³)	12,51	14,19
Cu ²⁺ (mg dm ⁻³)	0,85	1,39
Mn ²⁺ (mg dm ⁻³)	0,80	0,00
Zn ²⁺ (mg dm ⁻³)	0,73	0,24
Mo (mg dm ⁻³)	<LD	<LD
Areia total (g kg ⁻¹)	885,00	846,00
Areia grossa (g kg ⁻¹)	618,00	559,10
Areia fina (g kg ⁻¹)	26,70	28,68
Silte (g kg ⁻¹)	32,00	1,00
Argila (g kg ⁻¹)	83,00	153,00
Classe textural	Areia	Areia franca
	0,60 m	
N _{total} (g kg ⁻¹)	0,30	
δ ¹⁵ N(‰)	6,37	

CTC: capacidade de troca catiônica. COT: carbono orgânico total. <LD: abaixo do limite de detecção.

A caracterização física consistiu na avaliação granulométrica pelo método do densímetro para definição da classe textural. A caracterização química consistiu na análise de pH em água (1:2,5); acidez potencial extraída com acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺ foram extraídos em KCl 1,0 mol L⁻¹ e determinados por titulometria. O P, K⁺, Na⁺, Mn, Fe, Cu, Zn e Mo foram extraídos com Mehlich 1. O P foi determinado por espectrofotometria; o K e Na por fotometria de chama; o Mo, em espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES); os demais micronutrientes foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica; carbono orgânico total (COT) foi obtido por combustão úmida com dicromato de potássio e determinado por titulometria. A partir desses resultados foram calculadas a saturação de bases (V%), saturação de Al (m%), e as capacidades de troca catiônica (CTC) efetiva e potencial. O $\delta^{15}\text{N}$ foi determinado por espectrometria de massa, no Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP.

3.2 Condução experimental

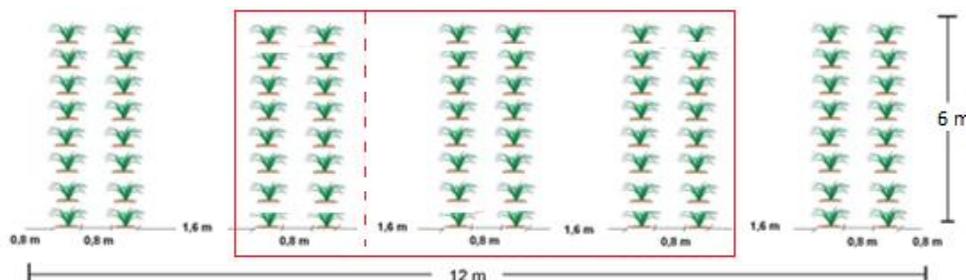
Foram avaliadas as variedades de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579, por serem as mais cultivadas no Brasil e no Nordeste, respectivamente (RIDESA, 2020). As sementes foram fornecidas pela Miriri Alimentos e Bioenergia S/A. As variedades foram submetidas a duas doses de adubação nitrogenada (0 e 60 kg ha⁻¹), duas doses de molibdênio (0 e 400 g ha⁻¹), e duas condições de inoculação bacteriana (sem e com). As variedades foram analisadas separadamente, utilizando delineamento experimental em blocos completos ao acaso, e arranjo de tratamentos em fatorial (2 x 2 x 2), com 4 repetições, totalizando 36 unidades experimentais para cada variedade (Apêndice A).

Cada parcela foi composta por 10 sulcos de plantio com seis metros de comprimento, e espaçamento duplo (1,6 m x 0,8 m), totalizando 72 m² por parcela (Figura 3). A área útil foi composta dos seis sulcos centrais, descartando um metro do início e do final do sulco, totalizando 28,8 m². Dentro da área útil, dois sulcos foram destinados à amostragem destrutiva e os outros 4 sulcos foram destinados à amostragem não destrutiva.

A adubação fosfatada e o fornecimento dos micronutrientes ocorreu em todas as parcelas no sulco de plantio. Para fósforo, considerando o seu teor disponível e a textura do solo (SIMÕES NETO et al., 2011), aplicou-se 180 kg ha⁻¹ de P₂O₅, utilizando superfosfato triplo para atender 50 kg de P₂O₅, e fosfato natural reativo para o restante da dose recomendada. Adubação de micronutrientes foi baseada no Manual de Recomendação de Adubação para o Estado de Pernambuco (IPA, 2008), fornecendo 2,6 kg ha⁻¹ Mn, 1,3 kg ha⁻¹ Cu, e 2,0 kg ha⁻¹ Zn, na forma de sulfato de manganês, sulfato de cobre, sulfato de zinco, respectivamente. As

fontes foram diluídas em água e aplicadas com auxílio de pulverizador costal, utilizando volume de calda de 200 L ha⁻¹. A dose de boro foi atendida com a aplicação de fosfato natural reativo (0,03% B).

Figura 3 - Ilustração da unidade experimental com destaque para área útil subdividida em área de amostragem destrutiva (à esquerda) e não destrutiva (à direita)



A adubação potássica foi realizada em cobertura em todas as parcelas, com base na expectativa de produção de 100 Mg ha⁻¹ (ROCHA, 2017). Aos 60 dias após o plantio (DAP) foi aplicado 150 kg ha⁻¹ de K₂O, na forma de cloreto de potássio.

A dose de molibdênio (400 g ha⁻¹) foi selecionada após avaliação do estudo de Oliveira (2012) em solos da mesma região e por ser utilizada nos estudos de fixação biológica de nitrogênio (SCHULTZ et al., 2014;2016). Como fonte utilizou-se o ácido fosfomolibdico (líquido), aplicados no sulco de plantio com auxílio de pulverizador costal.

A escolha da dose de nitrogênio (60 kg ha⁻¹) e da bactéria utilizada se baseia no estudo da interação da adubação nitrogenada, molibídica e inoculação em cana-de-açúcar, realizado por Silva (2016). A adubação nitrogenada foi realizada de forma parcelada, aplicando-se 1/3 da dose no sulco de plantio, e 2/3 em cobertura (60 DAP), utilizando como fonte nitrato de amônio. Como inoculante foi utilizada a bactéria promotora do crescimento *Stenotrophomonas sp.* (UAGC 869), obtida da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Genética e Biotecnologia Microbiana (LGBM) da unidade acadêmica de Garanhuns da UFRPE. A bactéria foi isolada do tecido radicular da variedade de cana-de-açúcar RB867515 com 4 meses de idade (LIMA et al., 2018), e selecionada pelos resultados positivos sobre a produção de biomassa aérea e radicular da cana-de-açúcar nos estudos realizados por Silva (2016) e Lima et al. (2018).

O plantio ocorreu de forma manual nos dias 18 e 19 de dezembro de 2018, com densidade de 15 gemas por metro. A variedade RB867515, com 7 meses de idade, foi plantada em colmos dispostos em corrente, de modo que a ponta de um coincidissem com a base do outro. Posteriormente, os colmos foram cortados em rebolos. A variedade RB92579, com 11 meses

de idade, foi plantada em rebolos que foram cortados antes do plantio, reunidos em galeias em quantidade necessária para cada sulco, e então distribuídos.

Após aplicação dos insumos e semeio, os sulcos foram fechados de forma manual, com auxílio de enxada. A área não recebeu aplicação de herbicida, realizando-se o controle de plantas daninhas por meio de capina manual, a fim de evitar inibição da germinação das plantas referência.

3.3 Preparo do inoculante e inoculação

O inoculante bacteriano foi preparado no laboratório de Biologia do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, utilizando o meio de cultura Tryptone Soya Agar 10% (TSA) líquido com pH 7,3.

A bactéria foi multiplicada a partir da repicagem de colônias isoladas em placa de Petri, para meio líquido (pré-inóculo), mantido sob agitação a 250 rpm por 11 horas. Após esse tempo, o pré-inóculo foi transferido para fermentador, mantido sob aeração forçada por 7 horas, quando atingiu a população mínima de 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL (ARAÚJO et al., 2010). O inoculante líquido foi então adicionado aos sacos de turfa esterilizada (Apêndice C). Os tempos de crescimento citados foram definidos a partir do preparo da curva de crescimento bacteriano (Apêndice B).

A metodologia de inoculação da cana-de-açúcar em campo foi a imersão dos rebolos em solução inoculante, utilizando 1,250 kg de inoculante turfoso a cada 100 L de água (SCHULTZ et al., 2016). Os rebolos foram colocados em sacos de rafia e imersos pelo período de 30 minutos (LIMA et al., 2018) em reservatórios de 1.000 L mantidos à sombra, mexendo a cada 10 minutos (Apêndice D).

Realizou-se nova aplicação 30 DAP, por aspersão sobre a linha de plantio germinada, utilizando regador. Uma nova calda de 600 L foi preparada e aplicou-se o volume de 12 L por parcela, aspergindo igualmente cada linha inoculada.

3.4 Cultivo de plantas referências

As plantas utilizadas como referência foram sorgo IPA SF15 (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) e girassol BRS 122 (*Helianthus annuus* L.), adquiridas da coleção de sementes do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA. Tais plantas foram escolhidas por apresentarem baixa diluição isotópica (ANTUNES et al., 2019; SILVA, 2016; SILVA, 2018).

Aos 30 DAP, realizou-se o plantio em covas, em uma parcela situada no final de cada bloco, em que foi delimitada uma área para o sorgo e para o girassol (Apêndice A). A adubação

e quantidade de sementes por cova seguiu as recomendações do Manual de Recomendação de Adubação para o Estado de Pernambuco (IPA, 2008), exceto para nitrogênio. A dose aplicada de N foi a mesma fornecida à cana (60 kg ha^{-1}), parcelando 1/3 no plantio e 2/3 aos 15 DAP (em cobertura, após o desbaste). Metade das plantas referência não recebeu nitrogênio, com o objetivo de fornecer as mesmas condições de disponibilidade de nitrogênio da cana-de-açúcar.

3.5 Coleta de dados e determinação das variáveis avaliadas

3.5.1 Parâmetros morfofisiológicos

Na área útil reservada para amostragem destrutiva, as plantas contidas em um metro delimitado de forma aleatória foram coletadas aos 140 e 340 DAP. As plantas coletadas foram avaliadas quanto às variáveis biométricas, segundo metodologia proposta por Marafon (2012). A altura de planta foi medida da base até a inserção da folha +1 (primeira folha superior com a lígula visível, de acordo com o sistema de ordenação Kuijper), utilizando trena. O diâmetro foi medido no terço médio do colmo, utilizando paquímetro.

Após avaliação biométrica, as folhas +1 de cada planta foram reunidas, e material restante foi separado nos componentes folhas (reunindo folhas verdes e folhas secas aderidas às plantas) e colmos. Cada componente foi pesado para obtenção da biomassa fresca, e em seguida processados separadamente em forrageira. O material processado foi subamostrado, pesado e posto para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 65°C , até atingir peso constante. Depois de secas, as subamostras foram novamente pesadas para determinação da umidade e da massa seca da parte aérea, expressa em g planta^{-1} . O material seco foi triturado em moinho de facas e conduzido à avaliação do teor de N (g kg^{-1}) por meio digestão sulfúrica, seguida de destilação pelo método Kjeldahl e titulação com solução diluída de HCl (EMBRAPA, 2009).

Aos 150 DAP, na área útil reservada para amostragem não destrutiva realizou-se a contagem de colmos (perfilhamento), descontando as falhas de brotação (linhas sem planta maiores do que 0,5 m) (STOLF, 2015), para estimar o número de colmos por metro.

No final do ciclo, após a queima das folhas, a área útil destinada à amostragem não destrutiva foi colhida por meio de corte manual. Os colmos foram reunidos e pesados com auxílio de dinamômetro analógico, para estimativa da produção de colmos por hectare (TCH). Um conjunto de 10 colmos foram conduzidos ao laboratório da Miriri Alimentos e Bioenergia S/A para análise dos atributos de qualidade industrial e estimativa da produção de açúcar por hectare (TPH).

3.5.2 *Análise nutricional*

O conjunto de folhas +1 separadas durante a coleta dos parâmetros morfofisiológicos foram postas para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 65°C, até atingir peso constante. O material seco foi separado em terço médio (sem nervura central) e material restante (inclui a nervura central), e triturados separadamente em moinho de facas.

O teor de Mo (mg kg⁻¹) foi determinado no terço médio folha +1 (excluindo a nervura central). O material vegetal foi digerido em solução nítrico-perclórica, e o extrato submetido à reação KI + H₂O₂ na presença de BRIJ-35 20% (método catalítico). As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda 420 nm. O teor do nutriente foi calculado com base em equação linear obtida pela de curva padrão (EMBRAPA, 2009).

Para análise de N na folha +1, uma subamostra do terço médio foi misturada ao material restante. Essa mistura foi moída em moinho de bola, até atingir aspecto de pó fino. O teor de N (g kg⁻¹) foi determinado em espectrômetro de massa, no Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP.

3.5.3 *Fixação biológica de nitrogênio atmosférico*

A estimativa da fixação biológica de nitrogênio da cana-de-açúcar foi realizada utilizando a metodologia de abundância natural de ¹⁵N. A razão isotópica da cana-de-açúcar foi determinada nas folhas +1 (BODDEY et al., 2001), na mesma amostra preparada para avaliação do teor de N (avaliação nutricional). A razão isotópica das plantas referência foi determinada na biomassa aérea de três plantas coletadas em cada parcela, 60 dias após o plantio. As plantas foram selecionadas quanto ao desenvolvimento e fitossanidade, trituradas e postas para secar em estufa de circulação forçada de ar, a 65°C, até atingir peso constante.

As amostras de cana-de-açúcar e plantas referências foram encaminhadas ao Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP, para determinação do teor de ¹⁵N em espectrômetro de massa. Os resultados foram expressos em δ¹⁵N‰. Quando houve diferença significativa entre os valores de δ¹⁵N da cana-de-açúcar e a planta referência, foi a estimada percentagem de N proveniente do ar, utilizando a equação proposta por Shearer & Kohl (1986):

$$\%N_{dda} = [100 \times (\delta^{15}N_{ref} - \delta^{15}N_{fix}) / \delta^{15}N_{ref} - B]$$

Onde, %N_{dda} é a estimativa da porcentagem de N proveniente da FBN na cana-de-açúcar; δ¹⁵N_{ref} é a estimativa da abundância natural de ¹⁵N na planta de referência (não fixadora); δ¹⁵N_{fix} é a estimativa da abundância natural de ¹⁵N na cana-de-açúcar (fixadora). B é o valor de δ¹⁵N

para plantas fixadoras cultivadas na ausência de N. Foi considerado B = 0‰ (CARVALHO et al., 2017).

3.5.4 Atividade da enzima redutase do nitrato

A atividade da enzima redutase do nitrato (ARN) foi avaliada aos 140 DAP, seguindo a metodologia de Jaworski (1971) com modificações proposta por Santos et al. (2014). A coleta ocorreu entre 11:30 h e 13:30 h, levando cerca de 25 minutos para cada bloco. O terço médio de oito folhas +1 (SANTOS et al., 2018a) foi coletado dentro da área útil, envolvido em papel alumínio (lado fosco) e acondicionados em caixa de isopor com gelo. Ao final da coleta, as amostras foram conduzidas ao laboratório e preparadas para análise.

A nervura central dos terços médios foram removidos e foram feitos 25 discos foliares de 1 cm de diâmetro com auxílio de furador, contemplando os dois lados do limbo. Os discos foram colocados em recipientes plásticos de cor preta fosca, aos quais foi adicionada solução de incubação de 10 mL (2,5 mL de KNO_3 300 mmol L^{-1} + 2,5 mL de tampão fosfato 285 mmol L^{-1} com pH 7,3 + 1,0 mL de Tween 20 a 0,6% (v/v) + 4,0 mL de água deionizada). O período de incubação foi de 90 minutos, a 32°C.

Após incubação, 0,5 mL do extrato foi transferido para recipiente plástico de 50 mL, em que foram adicionados reagentes de leitura (0,5 mL de solução de sulfanilamida (1%) em HCl 3 mol L^{-1} + 0,5 mL de dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (0,02%) + 2,5 mL de água deionizada). Após o tempo de reação de 20 minutos, a determinação foi feita em espectrofotômetro UV-VIS, no comprimento de onda de 540 nm. A ARN foi estimada em μmol de nitrito liberado por g de tecido fresco, por hora de incubação ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1} \text{NO}_2^-$), calculada com base em equação linear obtida pela de curva padrão.

3.5.5 Biomassa radicular

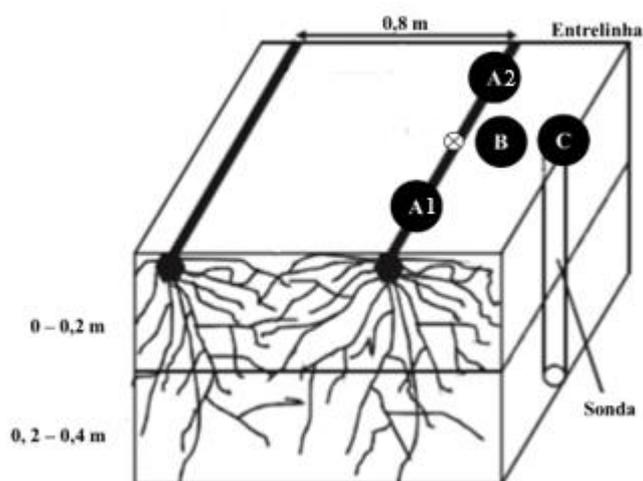
A biomassa radicular foi avaliada aos 180 DAP seguindo o procedimento amostral descrito por Otto et al. (2009) com adaptações para o espaçamento duplo.

Na área útil para amostragem destrutiva, uma touceira foi escolhida, evitando os pontos de amostragem dos parâmetros morfofisiológicos. As amostras foram coletadas em quatro pontos em torno da touceira, sendo dois pontos na linha de plantio (A1 e A2) e dois pontos na entrelinha (B e C) (Figura 4), com auxílio de sonda amostradora de raiz (0,055 m de diâmetro interno). Os pontos na linha de plantio estavam distantes 0,3 m na frente e atrás do centro da touceira. Os pontos da entrelinha estavam a 0,3 m (B) e a 0,6 m (C) do centro da touceira. As

amostras foram retiradas em duas profundidades (0 a 0,2 m, e 0,2 a 0,4 m), totalizando oito amostras por parcela.

As amostras de cada ponto foram lavadas com água corrente, sobre peneiras empilhadas, com abertura de malha de 2 mm e 1 mm. Depois de lavadas, as raízes foram separadas da terra com pinça sobre papel branco (Apêndice D), colocadas em sacos de papel, e conduzidas para estufa de circulação forçada de ar, a 65°C, até peso constante. Depois de secas, as amostras foram pesadas e os dados expressos em gramas de massa seca por volume de solo (g dm^{-3}).

Figura 4 - Ilustração dos pontos de coleta de amostras de raiz em torno de uma touceira de cana-de-açúcar.



Fonte: Adaptado de Otto et al. (2009)

3.6 Análise estatística

Os resultados das variáveis avaliadas foram analisados quanto aos critérios de distribuição normal e homocedasticidade dos dados. Quando necessário, os dados foram transformados a fim de ajustá-los aos critérios. Dados com distribuição normal e/ou homocedásticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA, $p \leq 0,10$).

Os efeitos isolados ou da interação entre os fatores adubação nitrogenada, adubação molíbdica e inoculação bacteriana, quando significativos, foram submetidos ao teste de Tukey ($p \leq 0,10$). Para avaliação da diluição isotópica do ^{15}N , os dados de $\delta^{15}\text{N}$ foram submetidos ao teste t (LSD) ($p \leq 0,10$). O nitrogênio acumulado e a quantidade de nitrogênio fixado (Nfix) foi submetido ao teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As variedades apresentaram respostas diferentes aos tratamentos. A RB867515 mostrou resposta à adubação nitrogenada e molibídica para a maioria das variáveis analisadas. Para a RB92579 houve predomínio de resposta ao nitrogênio e inoculação bacteriana, e pouca resposta ao molibdênio.

O comportamento varietal é resultado do melhoramento genético em resposta à interação genótipo-ambiente. Os clones selecionados apresentam características morfológicas e fisiológicas desejáveis para condições de produção específicas (SILVA, 2017b). A diferença no metabolismo do N entre as variedades é um dos fatores de variação entre genótipos de cana-de-açúcar. Oliveira et al. (2016) constataram essa variação, e identificaram maior exigência em N para RB92579 em comparação à RB867515, que apresenta maior eficiência de conversão do N em biomassa. Comportamento diferente entre as variedades à adubação nitrogenada na cana planta foi verificada por Santos et al. (2019a), avaliando as formas de N, atividade enzimática e produção de massa seca.

Além do fator genético, a interação da cana-de-açúcar com a microbiota naturalmente associada às variedades pode ser um dos fatores que contribuem para o bom desempenho das plantas em ambientes com limitação de recursos (BALDANI et al., 2002). A inoculação pode modificar a resposta fisiológica das plantas, de forma diferente entre as variedades e ambientes, como verificado por Pereira et al. (2013), Schultz et al. (2014; 2016), Lima et al. (2018).

4.1 Teor de nitrogênio na folha +1

A adubação nitrogenada promoveu incremento do teor de nitrogênio foliar em ambas as variedades (Tabela 2), que representa o aumento do acúmulo de N pela planta (Tabela 3). Dessa forma, o teor foliar permite uma previsão sobre a produção de biomassa e produtividade das plantas (CALHEIROS et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013).

O teor de nitrogênio foliar de ambas as variedades esteve abaixo da faixa ótima (13,4 a 20 g kg⁻¹) estabelecida para a região Sudeste do Brasil (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997; REIS JUNIOR; MONNERAT, 2003), o que indica que o nutriente estaria limitando a produção. Calheiros et al. (2018) avaliaram variedades de cana-de-açúcar cultivadas no Nordeste e identificaram que o teor médio de 17 g kg⁻¹ foi excessivo, o que indica que o teor foliar ótimo para produtividade superior à 80 kg ha⁻¹ para o Nordeste é inferior ao estabelecido para o Sudeste. Silva (2017a) encontrou valores semelhantes para as mesmas variedades e ciclo,

utilizando doses entre 60 e 80 kg ha⁻¹ em plantas cultivadas também no Nordeste, indicando que o teor obtido é adequado.

Tabela 2 - Teor de nitrogênio (N) e molibdênio (Mo), e atividade da enzima redutase do nitrato (ARN), avaliados na folha índice (+1) da cana planta (RB867515 e RB92579), aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto - PB

	N g kg ⁻¹			Mo mg kg ⁻¹			ARN μmol NO ₂ ⁻ g ⁻¹ h ⁻¹		
RB867515									
	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média
-N	10,71	9,90	10,30 B	0,81	1,18	1,00	0,13	0,13	0,13
+N	11,20	11,53	11,36 A	0,74	0,97	0,85	0,14	0,15	0,14
-Mo	10,94	9,99	10,47 B	0,67 Ab	1,75 Aa	1,21	0,13	0,12	0,12
+Mo	10,97	11,43	11,20 A	0,88 Aa	0,39 Ba	0,64	0,14	0,16	0,15
Média	10,95	10,71		0,78	1,07		0,13	0,14	
ANAVA	F			F ¹			F ²		
N	6,50**			2,04 ^{ns}			0,28 ^{ns}		
Mo	3,12*			13,64***			0,62 ^{ns}		
Bac	0,34 ^{ns}			0,98 ^{ns}			0,01 ^{ns}		
N*Mo	0,16 ^{ns}			0,36 ^{ns}			0,35 ^{ns}		
N*Bac	1,85 ^{ns}			0,16 ^{ns}			0,17 ^{ns}		
Mo*Bac	2,86 ^{ns}			9,03***			0,26 ^{ns}		
N*Mo*Bac	0,72 ^{ns}			0,35 ^{ns}			0,10 ^{ns}		
CV%	10,85			28,46			21,37		
RB92579									
	-N	+N	Média	-N	+N	Média	-N	+N	Média
-Mo	11,95 Aa	12,17 Aa	12,06	0,51	0,40	0,45 B	0,11 Aa	0,13 Aa	0,12
+Mo	11,53 Ab	12,61 Aa	12,07	1,09	0,86	0,98 A	0,10 Ab	0,19 Aa	0,15
Média	11,74	12,39		0,80	0,63		0,11	0,16	
ANAVA	F			F ²			F ²		
N	7,56**			2,81 ^{ns}			11,81***		
Mo	0,00 ^{ns}			20,56***			0,10 ^{ns}		
Bac	0,01 ^{ns}			0,41 ^{ns}			0,32 ^{ns}		
N*Mo	3,33*			0,12 ^{ns}			8,12***		
N*Bac	0,08 ^{ns}			0,13 ^{ns}			2,35 ^{ns}		
Mo*Bac	0,07 ^{ns}			0,35 ^{ns}			0,52 ^{ns}		
N*Mo*Bac	1,75 ^{ns}			0,55 ^{ns}			0,70 ^{ns}		
CV%	5,54			17,18			15,55		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns}não significativo, *** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,10$ pelo teste F. Dados transformados em $^{1}[\sqrt{(x^{-1})}]$ e $^{2}[\sqrt[3]{(x)}]$.

O efeito positivo da adubação foi observado em todas as variáveis de crescimento da parte aérea aos 140 DAP (Tabela 5 e 6), e se manteve até o final do ciclo (Tabela 8), contribuindo para ganhos na produção de colmos e de açúcar (Tabela 9).

A adição de N-fertilizante disponibiliza o nitrogênio mineral na solução do solo, de onde pode ser absorvido pelas plantas. A comunidade microbiana nativa ou inoculada pode ser beneficiada, intensificando os mecanismos benéficos às plantas (GOSAL et al., 2012). Em solo com baixa disponibilidade de N, a adubação nitrogenada pode ativar o N nativo por meio de

incremento da mineralização. O efeito *priming* positivo aumenta a disponibilidade e a absorção do nitrogênio do solo pelas plantas (LIU et al., 2017; ZANG et al., 2017).

Esse processo pode ser um dos fatores que contribuem para a menor contribuição do fertilizante no N acumulado na cana planta (FRANCO et al., 2011). A mineralização da matéria orgânica e a fixação biológica de nitrogênio podem ser a principal fonte de N para as plantas (OLIVEIRA et al., 2010; OTTO et al., 2013). Em solos pobres em matéria orgânica, como solo da área em estudo, a menor disponibilidade natural de N contribui para que fixação biológica seja uma importante fonte de N para o sistema. Apesar do potencial de contribuição da FBN para a cana-de-açúcar, o fornecimento de N por essa via é limitado, e não atende a necessidade da planta, mesmo com inoculação (REIS et al., 2016; SCHULTZ et al., 2014; URQUIAGA et al., 2012). Dada a importância do N para o desenvolvimento da cana-de-açúcar, o fertilizante deve ser fornecido para não comprometer a produção do canavial (VALE et al., 2011; TRIVELIN et al., 2002).

As plantas que não receberam nitrogênio apresentaram menor acúmulo de N (Tabela 3), o que reduziu o crescimento (Tabela 5) e produção de massa seca da parte aérea (Tabela 6). Tais resultados reforçam a importância da adubação nitrogenada no ciclo de cana planta, sobretudo em solos com estoque baixo de matéria orgânica (Tabela 1). As doses de eficiência agrônômica no ciclo variam de 40 a 80 kg ha⁻¹ de N, e quando acompanhadas de inoculação podem resultar em produtividade semelhante à de doses altas de N (FRANCO et al., 2010; OLIVER, 2014; PEREIRA et al., 2018). Na RB92579 a interação N*Bac aumentou a massa seca total aos 140 e 340 DAP.

O molibdênio atuou de forma isolada e combinada com nitrogênio para aumento do teor de N das variedades aos 140 DAP (Tabela 2). Na RB867515 são observadas respostas à aplicação de Mo no metabolismo de N (LI-PING; YANG-RUI; LI-TAO, 2007; MELLIS et al., 2016; ORLANDO FILHO, 2010; SANTOS et al., 2018b; VIEIRA, 2015). A adição isolada de N e de Mo aumentou o teor foliar e acúmulo de N e desenvolvimento da parte aérea e radicular (Tabelas 5 a 7). A ação isolada desses fatores indica a influência em diferentes fenômenos para melhor nutrição nitrogenada e desenvolvimento da cana planta. Na RB92579, a interação N*Mo mostrou que a adição de Mo aumenta o teor de N na folha somente quando há adubação nitrogenada, o que esteve correlacionado com a atividade da redutase do nitrato.

4.2 Teor de molibdênio na folha +1

Em ambas as variedades de cana-de-açúcar avaliadas, o teor foliar de Mo está acima do nível crítico estabelecido para a cultura, que varia de 0,15 a 0,3 mg kg⁻¹ (SPIRONELLO et al.,

1997; MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997). O solo arenoso e com pH do solo 6,3 (Tabela 1) promoveu alta disponibilidade do Mo aplicado, e consequentemente, maior absorção pelas plantas (HAMLIN, 2007; TEJADA-JIMÉNEZ et al., 2013). Vieira (2015) encontrou valores aproximados para a cana planta em campo, utilizando dose de $0,3 \text{ kg ha}^{-1}$, em solo com pH 5,4.

Apesar do baixo teor no solo (Tabela 1), o teor foliar alto de Mo obtido em plantas da RB867515 que não receberam adubação molíbdica pode ser explicado pela contribuição da adubação fosfatada. Os fertilizantes fosfatados solúveis (superfosfato triplo) e de rocha (fosfato natural reativo) contém traços de molibdênio em sua composição (CHARTER; TABATABAI; SCHAFER, 1995), e podem contribuir para o teor de Mo no solo (BARRON et al., 2008). Foi utilizada dose alta de fosfato natural reativo marroquino, um fertilizante de rocha fosfática com origem em sedimentos marinhos. Essas rochas apresentam alto acúmulo de Mo devido à condição de formação (CHENG et al., 2015; HELZ; VORLICEK, 2019). A adubação fosfatada foi aplicada em todas as parcelas, e pode ter contribuído também para o elevado teor foliar de Mo para as duas variedades.

Entre os tratamentos, o teor de molibdênio foi menor em plantas da RB867515 adubadas com Mo (Tabela 2) devido ao maior crescimento e produção de massa seca de colmos (Tabela 5 e 6), que reduziu a concentração do nutriente por massa seca. O teor de Mo de plantas inoculadas e sem adubação molíbdica foi maior do que os demais tratamentos, indicando que a bactéria foi fator de aumento do Mo foliar nessa variedade (Tabela 2).

Isso pode estar associado à capacidade dos diazotróficos em complexar metais que estão em baixa concentração no meio (KRAEMER et al., 2015). Nutrientes relacionados com a FBN, como Mo, podem ser ligados à compostos orgânicos sintetizados pela bactéria diazotrófica, de modo semelhante ao que ocorre com o Fe na formação de sideróforos (BELLENGER et al., 2008). Além de complexar, esses micro-organismos são capazes de solubilizar esses elementos de minerais. A complexação e solubilização ocorrem em meio deficiente de N, como resposta à demanda da enzima nitrogenase para a realização da FBN (BARRON et al., 2008; LIERMANN et al., 2005; KRAEMER et al., 2015).

Na forma complexada, o nutriente pode ser absorvido não só pelos diazotróficos mas também pelas plantas em associação (KRAEMER et al., 2015). Sendo assim, nas parcelas inoculadas, o Mo oriundo do fertilizante fosfatado (aplicado em todas as parcelas) foi solubilizado e absorvido pelas plantas. As plantas inoculadas apresentaram as menor desenvolvimento, de forma que o teor do nutriente foi concentrado por unidade de massa seca.

Isso não ocorreu na RB92579. Nessa variedade, a adubação molíbdica promoveu incremento do teor foliar de Mo. A bactéria foi isolada da RB867515 (LIMA et al., 2018) e pode estabelecer com a variedade associação específica por meio de exsudação radicular (AHMED; HASNAIN, 2014; JACOBY et al., 2017). Além disso, o efeito de crescimento promovido pela bactéria na RB92579 (Tabelas 5 e 6) pode ter diluído o teor do nutriente por massa seca. A interação N*Mo aumentou o acúmulo de N (Tabela 3), o que está correlacionado com a produção de massa seca na cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2018b; VALE et al., 2011).

4.3 Atividade da enzima redutase do nitrato

A redutase do nitrato (RN) está ligada à assimilação de nitrogênio na forma de nitrato. A oferta desse nutriente no meio irá modificar a atividade da enzima (ARN), sobretudo em plantas que têm maior demanda pela forma nítrica. As variedades de cana-de-açúcar podem discriminar as formas de nitrogênio, assimilando preferencialmente nitrato ou amônio, de acordo com aspectos genéticos, fisiológicos ou disponibilidade no meio (ARMAS et al., 1992; ROBINSON et al., 2011; BOSCHIERO et al., 2019). Dessa forma, o comportamento varietal é refletido pela intensidade de resposta da ARN (TISCHNER, 2000; SANTOS et al., 2019a).

Tanto a RB867515 como a RB92579 mostraram valores baixos de ARN, o que pode estar relacionado com a fase de desenvolvimento das plantas. Santos et al. (2018a) mostraram que o período amostrado (140 DAP) corresponde a uma fase fenológica em que a ARN na folha de cana-de-açúcar é baixa. Santos et al. (2017) verificaram que plantas bem nutridas em N apresentam ARN baixa, mesmo na presença de nitrato em solução, devido à menor demanda pelo nutriente. ARN é regulada não somente pela concentração externa de nitrato, mas também pela concentração do íon no citosol, e pela concentração de amônio e aminoácidos dentro da célula (CRAWFORD; FORDE, 2002).

A ARN não diferiu entre tratamentos sem e com adição de nitrogênio ou molibdênio na RB867515 (Tabela 2). Esse comportamento difere dos relatos da literatura em que há estímulo da atividade da RN pela aplicação de nitrogênio e/ou molibdênio no solo (CARVALHO et al., 2014; SANTOS et al., 2019a). LI-PING, YANG-RUI e LI-TAO (2007) avaliaram doses de Mo no metabolismo de N da RB867515 e verificaram que a ARN foi baixa na fase de perfilhamento, e que maior atividade da RN ocorre com dose baixa de Mo. A aplicação de doses mais altas inibiram a ARN e a atividade da enzima glutamina sintetase (GS).

A avaliação da ARN consiste na reação da solução de incubação com o tecido fresco, e medição indireta da quantidade de nitrito formada durante o período de incubação. A intensidade de reação em discos foliares (SANTOS et al., 2014) pode ser influenciada pela

diferença da anatomia foliar promovida pelos tratamentos. Folhas bem nutridas se desenvolvem melhor e tornam-se mais espessas (REICH; ELLSWORTH; WALTERS, 1998), e a superfície de reação torna-se menor em folhas mais desenvolvidas, em reação a folhas de plantas não adubadas, considerando o mesmo número de discos e tempo de reação. Dessa forma, a quantidade de nitrito liberada pode ser subestimada, reduzindo a ARN de plantas bem desenvolvidas. A adaptação da metodologia sugerida por Santos et al. (2014), que substitui a pesagem do material vegetal (0,5 g) por 25 discos foliares de 1 cm de diâmetro, não considera tratamentos diferentes para amostragem. Além disso, Santos et al. (2018a) verificaram que o tempo de incubação de 90 minutos não atinge a máxima produção de nitrito, observada aos 400 minutos de incubação. Os autores mostraram que o tempo de 120 minutos seria o mínimo para evitar a subestimação da ARN.

A inoculação de bactéria diazotrófica pode modificar o metabolismo de N mediado pela RN em plantas. Por meio da FBN é disponibilizado N amoniacal, e quando associado ao Mo o mecanismo é intensificado (MA et al., 2019), disponibilizando mais amônio para as plantas. Nessa condição, a ARN de plantas que preferem a forma amoniacal, como é relatado para RB867515 (SANTOS et al., 2019a), é reduzida, já que parte do requerimento em N está sendo suprido pelo amônio, reduzindo a necessidade de assimilação de nitrato (CRAWFORD; FORDE, 2002).

A RB92579 apresentou ARN duas vezes maior com adição de nitrogênio, na presença de molibdênio (Tabela 2). O nitrato presente na célula sinaliza a síntese enzimática e induz a atividade da enzima, em condição de demanda por N. Na etapa final da síntese, o Mo é requerido para ativar o sítio de reação enzimática (TEJADA-JIMÉNEZ et al., 2013; BOSCHIERO et al., 2019). A RB92579 possui desenvolvimento mais lento que a RB867515, prolongando as fases de maior demanda de N. Esse comportamento varietal é refletido na intensidade de resposta ao metabolismo de nitrato (TISCHNER, 2000), concordando com a preferência pela forma nítrica relatada para RB92579 por Santos et al. (2019a).

4.4 Acúmulo de nitrogênio na parte aérea

A extração de nitrogênio foi positivamente influenciada pela adubação nitrogenada (Tabela 3), evidenciando que o solo estudado não apresenta estoque para atender a cultura no ciclo de cana planta, nas condições do estudo.

A interação N*Mo promoveu aumento do acúmulo de N nas duas variedades. Na RB867515 houve incremento de 37 kg ha⁻¹ de N acumulado com a interação N*Mo, em relação ao controle. No entanto, esse valor tem efeito mais significativo do nitrogênio, tendo em vista

que não diferiu da média da adição isolada de N (+42 kg ha⁻¹), e o ganho da adição isolada de Mo foi inferior (+13 kg ha⁻¹). Esse resultado concorda com o efeito não significativo da ARN para a variedade, em que a adição de Mo não aumentou a atividade da RN (Tabela 2).

Tabela 3 – Nitrogênio acumulado, sinal isotópico de ¹⁵N e estimativa da FBN (%Ndda), na cana planta (RB867515 e RB92579), avaliados aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto - PB

		N acumulado kg ha ⁻¹			Sinal isotópico $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$			Ndda %		
RB867515										
		-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média
-Bac	-N	25,90	38,90	46,3	4,49	3,63	4,05	3,31 Bb	20,21 Aa	11,73
	+N	62,02	58,39		3,96	4,14		12,81 Aa	10,58 Aa	
+Bac	-N	24,37	37,32	50,51	4,05	3,67	3,83	11,49 Aa	19,40 Aa	16,29
	+N	73,18	67,15		4,05	3,56		12,56 Aa	21,72 Aa	
	-N	25,13 Bb	38,11 Ba	31,62	4,27	3,65	3,96	7,40	19,81	13,60
	+N	67,60 Aa	62,77 Aa	65,19	4,01	3,85	3,93	12,69	16,15	14,42
	Média	46,37	50,44		4,14 a	3,75 b		10,04	17,98	
ANAVA		F ¹			F ²			F ³		
	N	62,15***			0,07 ^{ns}			1,69 ^{ns}		
	Mo	1,99 ^{ns}			4,33*			3,30*		
	Bac	0,32 ^{ns}			1,31 ^{ns}			0,52 ^{ns}		
	N*Mo	6,82***			1,73 ^{ns}			1,76 ^{ns}		
	N*Bac	1,15 ^{ns}			0,01 ^{ns}			0,19 ^{ns}		
	Mo*Bac	0,05 ^{ns}			0,02 ^{ns}			0,30 ^{ns}		
	N*Mo*Bac	0,01 ^{ns}			2,75 ^{ns}			5,21**		
	CV%	8,56			18,61			42,30		
RB92579										
		-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média
-Bac		40,11	43,81	41,96 B	3,54	3,71	3,63	25,55	22,69	24,12
+Bac		59,68	50,38	55,03 A	3,71	3,60	3,63	18,35	20,91	19,63
	-N	43,84 Aa	31,54 Ba	37,69	3,49	3,74	3,61	26,74	17,84	22,29
	+N	55,95 Aa	62,64 Aa	59,29	3,77	3,58	3,67	17,16	25,75	21,45
	Média	49,89	47,09		3,63	3,66		21,95	21,80	
ANAVA		F			F			F ¹		
	N	25,17***			0,12 ^{ns}			0,30 ^{ns}		
	Mo	0,42 ^{ns}			0,02 ^{ns}			0,10 ^{ns}		
	Bac	9,21***			0,02 ^{ns}			0,10 ^{ns}		
	N*Mo	4,86**			1,78 ^{ns}			1,54 ^{ns}		
	N*Bac	1,42 ^{ns}			0,14 ^{ns}			0,00 ^{ns}		
	Mo*Bac	2,28 ^{ns}			0,76 ^{ns}			0,06 ^{ns}		
	N*Mo*Bac	2,88 ^{ns}			0,15 ^{ns}			0,34 ^{ns}		
	CV%	25,12			12,60			19,67		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns}não significativo, *** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,10$ para o teste F. Dados transformados em $1[\sqrt[3]{x}]$, $2[\sqrt[3]{x^3}]$, $3[\sqrt[3]{x+0,5}]$. Ndda: nitrogênio derivado do ar, utilizando o $\delta^{15}\text{N}\text{‰}$ médio das plantas referências.

Na RB92579, a adubação nitrogenada em interação com Mo e/ou Bac aumentou o acúmulo de nitrogênio (Figura 5). O efeito isolado de N apresentou menor acúmulo de N e não diferiu dos outros tratamentos que não receberam nitrogênio, o que indica que dose não atende a necessidade da cultura. Na presença de Mo o acúmulo de N foi duas vezes maior que o

controle. Esse resultado está associado ao aproveitamento no nitrato do solo por meio da ARN (Tabela 2). Incremento semelhante foi verificado por Oliveira (2012) utilizando a dose de Mo mais baixa ($0,2 \text{ kg ha}^{-1}$). Santos et al. (2019a) também identificaram efeito da interação N*Mo na nutrição nitrogenada dessa variedade por meio da ARN.

Houve efeito isolado da inoculação no acúmulo de N da RB92579, com ganho de mais de 10 kg ha^{-1} de N (Tabela 3). Dada a ausência de resposta da inoculação na FBN, o ganho decorre da atuação de outros mecanismos benéficos que a bactéria inoculada pode realizar (LIMA et al., 2018). Pedula et al. (2016) estudando a variedade verificaram maior acúmulo de N e de outros macronutrientes com inoculação.

Não foi verificada resposta da inoculação para a RB867515. Outros estudos não verificam resposta da inoculação, no entanto, as plantas inoculadas apresentam desempenho semelhante ao de plantas adubadas (PEREIRA et al., 2013, 2016; SCHULTZ et al., 2012, 2014). A variedade apresenta menor exigência em N e alta eficiência de uso do nutriente do solo, que pode ser disponibilizado pela mineralização da socaria anterior (OLIVEIRA et al., 2016; TRIVELIN et al., 2002). Além disso, o bom desempenho pode ser resultado da associação com a comunidade bacteriana eficiente selecionada ao longo dos anos de cultivo (BALDANI et al., 2002; SCHULTZ et al., 2012).

4.5 Estimativa da fixação biológica de nitrogênio

Não houve diferença estatística entre plantas referência com e sem adubação nitrogenada, e o $\delta^{15}\text{N}$ de cada planta referência consiste no valor médio desses tratamentos (Tabela 4).

O sorgo é estudado como planta fixadora de nitrogênio (BARROS et al., 2020), no entanto, a variedade IPA SF15 apresentou baixa diluição isotópica no estudo realizado por Silva (2016). O $\delta^{15}\text{N}$ obtido por essa variedade de sorgo ($4,05\text{‰}$), no entanto, foi semelhante ao da cana-de-açúcar (Tabela 4). O girassol apresentou sinal isotópico mais alto ($5,04\text{‰}$), mantendo o comportamento observado por Silva (2018) e Silva (2017a), em diferentes condições de cultivo (casa de vegetação e campo).

O %Ndda médio da RB7515 foi de 21,8% e de 8,5%; e da RB92579 foi de 27,8% e 10%, utilizando girassol e sorgo, respectivamente, como plantas referência. Utilizando o $\delta^{15}\text{N}$ médio das plantas referência para estimar a FBN, as médias foram de 20,4% para a RB867515 e de 21,9% para a RB92579. Apesar da variação entre plantas referência, a proporção da FBN se manteve entre os tratamentos. O sorgo subestimou a FBN na cana-de-açúcar em ambas as

variedades, e o girassol mostrou-se como planta mais adequada para avaliação da FBN, obtendo estimativa semelhante à média das plantas referência.

Os valores médios de $\delta^{15}\text{N}$ da RB867515 (3,94‰) e da RB92579 (3,64‰) (Tabela 4). Sinal isotópico semelhante foi obtido por Santos et al. (2019b), Schultz et al. (2014) e Silva (2017a) no ciclo de cana planta. Nesses trabalhos os resultados quanto à FBN são variáveis. Schultz et al. (2016) obtiveram valores semelhantes no terceiro ciclo, quando houve FBN.

Tabela 4 – Sinal isotópico de $\delta^{15}\text{N}$ e estimativa da FBN (%Ndda) na cana planta (RB867515 e RB92579), avaliados aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto - PB

Referências	$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$	%Ndda ¹	%Ndda ²	%Ndda ³
Girassol	5,04	-	-	-
Sorgo	4,05	-	-	-
Média	4,55			
RB867515				
C0	4,49	10,91	-	-
N	3,96	21,35	2,13	-
Mo	3,63*	28,03	10,43	20,21
Bac	4,05	19,62	-	-
N*Mo	4,14	17,96	-	-
N*Bac	4,05	19,64	-	-
Mo*Bac	3,67*	27,26	9,48	19,40
N*Mo*Bac	3,56*	29,39	12,13	21,72
CV%	12,65			
RB92579				
C0	3,47*	31,10	14,26	30,77
N	3,62*	28,13	10,56	20,32
Mo	3,79*	24,73	6,33	16,55
Bac	3,51*	30,28	13,24	22,71
N*Mo	3,64*	27,88	10,25	28,82
N*Bac	3,91*	22,42	3,46	14,00
Mo*Bac	3,68*	27,06	9,23	19,14
N*Mo*Bac	3,52*	30,73	13,21	22,68
CV%	12,17			

*Médias diferem do $\delta^{15}\text{N}$ médio das plantas referências (4,55), pelo teste LSD ($p \leq 0,10$). Ndda: nitrogênio derivado do ar, calculado utilizando $\delta^{15}\text{N}$ do ¹girassol, ²sorgo, ³médio das plantas referências. C0: controle absoluto.

A planta fixadora deve apresentar $\delta^{15}\text{N}$ próximo de 0,0‰, e em plantas não fixadoras os valores devem ser altos e positivos, para que apresentem uma diferença mínima de 2% e os resultados de ocorrência da FBN sejam precisos (BODDEY et al., 2001; HOGBERG, 1997; FREITAS et al., 2015). No entanto, valores altos de $\delta^{15}\text{N}$ na cana-de-açúcar e diferença inferior a 2% em relação às plantas referências podem resultar em ocorrência da FBN, com contribuição média semelhante à obtida em ambientes com amplitude de $\delta^{15}\text{N}$ inferior a 2% (CARVALHO et al., 2017; SILVA, 2017a).

Fatores climáticos, como precipitação e temperatura, influenciam o sinal isotópico do solo, variando de acordo com a precipitação pluviométrica e temperatura. Em ambientes

naturais, o sinal isotópico é estabelecido em zonas climáticas, estudadas em escala de tempo anual (AMUNDSON et al., 2003). Santos (2018) identificou que o aumento da pluviosidade reduz a marcação isotópica do solo, o que reduz a diferença entre o $\delta^{15}\text{N}$ de plantas não fixadoras e plantas potencialmente fixadoras em áreas chuvosas. A autora encontrou ampla variação do sinal isotópico dentro da mesma região climática em áreas de produção agrícola. A curto prazo, em menor escala espacial e sob interferência antrópica, as relações isotópicas do ambiente podem diferir das observadas em ambientes naturais devido à interação dos fatores genótipo, manejo e ambiente, gerando respostas de caráter específico (AMUNDSON et al., 2003; HOGBERG, 1997).

Na RB867515 o Mo promoveu diluição isotópica, com diferença média de 0,76% em relação às plantas referências (Tabela 4). Na RB92579, a amplitude média foi de 0,91% e não houve influência dos fatores N, Mo e Bac para modificação do sinal isotópico da variedade.

Mesmo com diferença inferior a 2%, a FBN variou na RB867515 de 19% a 21%, e na RB92579 de 14% a 30%. Esse resultado não diferiu dos obtidos por Silva (2017a), cuja diferença isotópica entre plantas fixadoras e plantas referência foram superiores a 2%. Carvalho et al. (2017) trabalharam com as duas variedades de cana-de-açúcar, que apresentaram valores de delta superiores a 7‰, amplitude de inferior a 2%, e a média de FBN foi de 16%. Isso mostra uma manutenção da contribuição da FBN para a cana-de-açúcar nas diferentes condições ambientais, manejo e de amplitude de $\delta^{15}\text{N}$.

A adubação molíbdica aumentou o Ndda em 17% na RB867515 em plantas não inoculadas e sem adição de N (Tabela 3), o que correspondeu contribuição com 7 kg ha⁻¹ de N no acumulado pela planta. Essa contribuição não diferiu da promovida pelas interações Mo*Bac e N*Mo*Bac (Tabelas 3 e 4), que apresentou FBN média de 20,56%. Na presença de Mo há maior eficiência da nitrogenase, intensificando a ocorrência de FBN (SANTOS et al., 2019b; MA et al., 2019).

Na ausência de Mo, a adição de nitrogênio e/ou bactéria aumentou o Ndda da RB867515, com contribuição semelhante à obtida pela adição de Mo (Tabela 3). Esse resultado está associado ao efeito significativo da adição de N sobre o conteúdo de nitrogênio da planta. O suprimento de N ou de Mo estimulam mecanismos nas plantas e nos micro-organismos, resultando em promoção de crescimento (GLASS et al., 2012; GOSAL et al., 2012; SANTOS et al., 2019a).

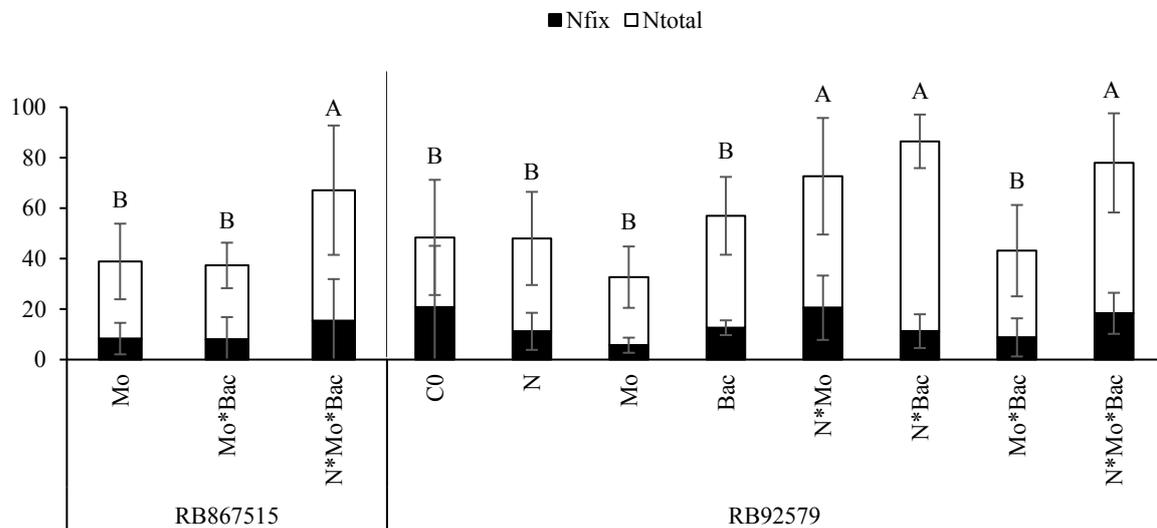
As médias de $\delta^{15}\text{N}$ da RB92579 diferiram da referência, indicando que houve FBN. N, Mo e Bac não promoveram diluição isotópica, nem do %Ndda, cuja média foi de 21,9%, que

correspondeu à contribuindo média de 10 kg ha⁻¹ de N. Os tratamentos que não receberam adubação nitrogenada apresentaram menor acúmulo de N e maior %Ndda.

O N fixado não diferiu entre os tratamentos para as duas variedades. A média de N fixado na RB867515 foi de 9,90 kg ha⁻¹, e na RB92579 foi de 10,61 kg ha⁻¹. A interação N*Mo*Bac resultou em aproximadamente 15 kg ha⁻¹ de N fixado para as duas variedades. Na RB867515 essa foi a maior quantidade de N fixado, enquanto na RB92579 o maior valor foi obtido com a interação N*Mo (17,4 kg ha⁻¹ de N) (Figura 5).

A resposta à aplicação de Mo na RB867515 indica que o nutriente foi fator limitante para a FBN no ambiente estudado. A ausência de resposta ao Mo sobre o sinal isotópico e %Ndda indica que o genótipo deve ser considerado no manejo do nutriente para estimular o mecanismo na cana-de-açúcar. Santos et al. (2019b) identificaram resposta diferente à aplicação de Mo sobre a atividade da nitrogenase (AN) das variedades RB867515 e RB92579. Na RB867515 a aplicação de Mo aumentou a AN, enquanto na RB92579 houve redução.

Figura 5 - Nitrogênio acumulado (N total) e nitrogênio fixado da atmosfera (Nfix) nas variedades RB867515 e RB92579, aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto – PB



Letras maiúsculas iguais (N total) não diferem pelo teste Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Variedades analisadas separadamente. *Dados transformados em $\sqrt{(x^{-1})}$.

A contribuição média da FBN para a cana-de-açúcar foi de 21% independente da adição de N, Mo ou bactéria. Esse resultado se assemelha aos valores relatados para a cultura (BODDEY et al., 2001; URQUIAGA et al., 2012; SILVA, 2017a). O Ndda não aumenta com a inoculação, e é resultado da interação planta-bactéria e condições ambientais (SCHULTZ et al., 2017).

A contribuição foi a mesma na presença se na ausência de N. Yoneyama et al. (1997), Silva (2016) e Santos et al. (2019b) mostraram que a atividade fixadora é mantida em plantas que receberam adubação nitrogenada. Todavia, esse não é o fator que mais contribui para o desenvolvimento das plantas, tendo em vista a quantidade de N fixado do ar ser inferior àquela exigida para o máximo desenvolvimento da planta.

4.6 Parâmetros morfofisiológicos - 140 DAP

A bactéria inoculada isoladamente não mostrou potencial como fixadora de nitrogênio. Outros mecanismos benéficos estão, portanto, atuando na promoção do crescimento da cana-de-açúcar, tendo em vista que a inoculação teve efeito nos parâmetros morfofisiológicos de ambas as variedades (Tabela 5 e 6). A produção de hormônios vegetais e a solubilização de nutrientes podem explicar o aumento da produção de parte aérea e radicular em plantas inoculadas, em que a FBN não é verificada (PEDULA et al., 2016; SCHULTZ et al., 2014).

A adubação nitrogenada promoveu ganhos em todas as variáveis de crescimento da parte aérea da RB867515 aos 140 DAP (Tabela 5 e 6). O nitrogênio atua na síntese e ativação hormonal das plantas, desencadeando as reações de conversão dos nutrientes em biomassa e desenvolvimento, e esse mecanismo tem alta eficiência em plantas C4 (TAIZ et al., 2017). No início do desenvolvimento, quando há demanda pelo nutriente para o intenso crescimento, a adição de nitrogênio promoveu contribuições de mais de 50% na produção de massa seca das plantas (Tabela 6).

A inoculação na RB867515 reduziu o diâmetro do colmo, mas na presença de Mo não há efeito da inoculação. Nenhum dos fatores avaliados modificou o perfilhamento da variedade (Tabela 5). Na RB92579, N, Mo e Bac não modificaram o diâmetro do colmo aos 140 DAP, mas aumentou o perfilhamento da variedade. Como característica varietal, a RB92579 possui intensa produção de novos colmos na touceira durante o desenvolvimento vegetativo, de forma que o incremento nutricional durante a fase de perfilhamento resulta em maior número de perfilhos por metro (RIDESA, 2010).

Tanto o nitrogênio quanto o molibdênio influenciaram o crescimento em altura da RB867515 (Tabela 5). A adubação nitrogenada aumentou o comprimento das plantas em 38%, enquanto o Mo contribuiu com 8%. Na produção de massa seca de colmos, a interação N*Mo ilustra a relação metabólica entre esses nutrientes (Tabela 6). A adição de N tem o mesmo efeito da adição de Mo, uma vez que o Mo contribui para o aproveitamento do nitrogênio disponível no solo, por meio da assimilação do nitrato (GLASS et al., 2012).

O papel fisiológico do Mo das plantas é enzimático, ativando enzimas no metabolismo de macro e micronutrientes. Está relacionado com a assimilação de nitrato, síntese de clorofila e de hormônios, promovendo desenvolvimento das plantas. Os sintomas de deficiência de molibdênio podem ser confundidos com deficiência de nitrogênio (HAMLIN, 2007), assim como, a adubação molibídica em solos deficientes no nutriente gera resultados semelhantes aos promovidos pela adubação nitrogenada (SANTOS et al., 2019b; VIEIRA, 2015).

Tabela 5 - Variáveis biométricas (altura de planta, diâmetro do colmo e perfilhamento), da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliadas aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto - PB

	Altura de planta cm			Diâmetro do colmo cm			Perfilhamento plantas m ⁻¹		
	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média
RB867515									
-N	115,5	109,5	112,5 B	2,24	2,11	2,18 B	7,63	7,54	7,58
+N	152,9	156,7	154,8 A	2,47	2,43	2,45 A	7,61	8,05	7,83
-Mo	129,5	126,4	127,9 B	2,39 Aa	2,21 Ab	2,30	7,76	7,69	7,73
+Mo	138,9	139,8	139,3 A	2,32 Aa	2,34 Aa	2,33	7,48	7,90	7,69
Média	134,2	133,1		2,36	2,27		7,62	7,80	
ANOVA	F ¹			F			F		
N	53,80***			43,37***			1,64 ^{ns}		
Mo	3,72*			0,48 ^{ns}			0,04 ^{ns}		
Bac	0,03 ^{ns}			4,27*			0,78 ^{ns}		
N*Mo	0,25 ^{ns}			0,02 ^{ns}			0,01 ^{ns}		
N*Bac	1,03 ^{ns}			1,32 ^{ns}			1,78 ^{ns}		
Mo*Bac	0,44 ^{ns}			5,89**			1,51 ^{ns}		
N*Mo*Bac	2,13 ^{ns}			1,56 ^{ns}			0,13 ^{ns}		
CV%	4,10			5,05			7,24		
RB92579									
-N	96,60	101,71	99,15 B	2,21	2,18	2,20	9,37	9,29	9,33 B
+N	125,94	146,47	136,21 A	2,26	2,23	2,25	10,13	9,88	10,00 A
Média	111,27 b	124,09 a		2,24	2,21		9,75	9,59	
ANOVA	F			F			F		
N	34,60***			1,33 ^{ns}			5,40**		
Mo	0,09 ^{ns}			0,00 ^{ns}			0,26 ^{ns}		
Bac	4,14*			0,50 ^{ns}			0,32 ^{ns}		
N*Mo	0,70 ^{ns}			1,35 ^{ns}			0,23 ^{ns}		
N*Bac	1,50 ^{ns}			0,00 ^{ns}			0,09 ^{ns}		
Mo*Bac	0,11 ^{ns}			0,00 ^{ns}			1,11 ^{ns}		
N*Mo*Bac	0,00 ^{ns}			0,01 ^{ns}			0,40 ^{ns}		
CV%	15,14			5,70			8,46		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns}não significativo, *** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,10$ pelo teste F. Dados transformados em $^{1/3}\sqrt{(x)}$. Altura medida da base do colmo à inserção da folha +1. Diâmetro medido no terço médio do colmo.

O Mo atua na rota de síntese do hormônio regulador de crescimento ácido indol-acético (AIA) mediada pelo triptofano, sintetizado por uma enzima de molibdênio. Essa rota ocorre em bactérias diazotróficas que se associam com a cana-de-açúcar (ANTUNES et al., 2017; LIMA et al., 2018; SILVA et al., 2015), e a aplicação de molibdênio pode potencializar esse

mecanismo nas bactérias nativas e inoculadas. O efeito do Mo na produção de AIA, na FBN (Tabela 3) e no metabolismo do nitrato nas plantas, podem explicar os maiores diâmetro (Tabela 5), massa de colmos (Tabela 6), e produção de massa seca de raiz (Tabela 7) da RB87515.

Não houve efeito do Mo na RB92579. Esse resultado difere do estudo realizado por Santos et al. (2019a) com as mesmas variedades, em que a RB92579 apresentou maior resposta da aplicação de Mo do que a RB867515. A inoculação e adubação nitrogenada foram os fatores que promoveram o desenvolvimento da parte aérea da RB92579 (Tabela 5 e 6), o que está correlacionado com o maior acúmulo de N (Tabela 3).

Tabela 6 - Biomassa seca da parte aérea da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliada aos 140 dias após o plantio, em Rio Tinto - PB

	MS colmos g planta ⁻¹			MS folhas g planta ⁻¹			MS total g planta ⁻¹		
	-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média
RB867515									
-N	43,67 Ba	62,38 Aa	53,02	48,45	48,17	48,31 B	92,11	110,5	101,3 B
+N	85,96 Aa	82,19 Aa	84,08	68,84	69,35	69,10 A	154,8	151,5	153,2 A
Média	64,81	72,29		58,65	58,76		123,5	131,0	
ANOVA	F			F			F		
N	25,08***			19,76***			26,94***		
Mo	1,45 ^{ns}			0,00 ^{ns}			0,58 ^{ns}		
Bac	0,24 ^{ns}			1,34 ^{ns}			0,72 ^{ns}		
N*Mo	3,29*			0,01 ^{ns}			1,18 ^{ns}		
N*Bac	2,80 ^{ns}			0,35 ^{ns}			1,73 ^{ns}		
Mo*Bac	0,06 ^{ns}			0,45 ^{ns}			0,22 ^{ns}		
N*Mo*Bac	1,34 ^{ns}			0,20 ^{ns}			0,86 ^{ns}		
CV%	25,58			22,53			22,20		
RB92579									
	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média
-N	38,43	45,12	41,77 B	55,13	46,53	50,83 B	93,56 Aa	91,65 Ba	92,60
+N	61,63	75,95	68,79 A	56,72	62,82	59,77 A	118,3 Ab	149,2 Aa	133,8
Média	50,03 b	60,54 a		55,92	54,67		106,0	120,4	
ANOVA	F			F ¹			F		
N	22,52***			5,60**			22,58***		
Mo	0,14 ^{ns}			0,15 ^{ns}			0,49 ^{ns}		
Bac	3,41*			0,06 ^{ns}			2,79 ^{ns}		
N*Mo	0,29 ^{ns}			0,41 ^{ns}			0,05 ^{ns}		
N*Bac	0,45 ^{ns}			1,66 ^{ns}			3,58*		
Mo*Bac	0,37 ^{ns}			0,09 ^{ns}			0,35 ^{ns}		
N*Mo*Bac	0,19 ^{ns}			1,97 ^{ns}			2,04 ^{ns}		
CV%	29,13			6,81			21,65		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns}não significativo, *** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,10$ pelo teste F. Dados transformados em $2[\log(x)]$. MS: massa seca. MS folhas: folhas secas + folhas verdes + ponteiro. MS total: MS colmos + MS folhas.

O efeito isolado da inoculação na RB92579 modificou positivamente o crescimento da variedade, como também foi observado por Lima et al. (2018) e Pedula et al. (2016). Houve aumento da altura em 12% e da massa seca de colmos em 21%. O nitrogênio influenciou positivamente em todas as variáveis e apresentou maior ganho de altura (38%) (Tabela 5) e

massa seca de colmos (53%) (Tabela 6), em comparação com a bactéria. Os efeitos sobre o desenvolvimento da parte aérea se mantiveram até o final do ciclo (Tabela 8).

O efeito da interação N*Bac foi verificado na produção de massa seca total. Na presença de N, a inoculação aumentou a massa seca da parte aérea da RB92579 (Tabela 6). O aumento do conteúdo de N, altura e massa seca promovidos pela bactéria é resultado semelhante ao observado por Pedula et al. (2016) em estudo realizado com a mesma variedade e ciclo de produção. Os autores identificaram resposta da inoculação de forma isolada ou em interação com adubação com 50 kg ha⁻¹ de N. A inoculação incrementou o acúmulo de N, velocidade de crescimento inicial, produção de massa seca e índice de área foliar. Além disso, inoculação aumentou o acúmulo de outros nutrientes (P, K, Ca, Mg), superando o tratamento que recebeu apenas o fertilizante nitrogenado.

Os trabalhos que encontraram resultados positivos da inoculação e adubação nitrogenada relatam maior eficiência de uso dos fertilizantes pelas plantas inoculadas (GOSAL et al., 2012; OLIVER, 2014; PEREIRA et al., 2018). Na presença de N, as bactérias inoculadas aumentam a atividade promotora de crescimento (GOSAL et al., 2012), que beneficiam as plantas de forma direta e indireta (MEHMOOD et al., 2018). Mohite (2013) constatou maior produção de AIA por bactérias rizosféricas em meio de cultura com maior concentração de nitrogênio, confirmando o efeito estimulante do nitrogênio na produção do AIA. Outros fitohormônios são produzidos por bactérias, como giberelinas e citocininas, e atuam regulando o crescimento das raízes e parte aérea de plantas (SILVA et al., 2015).

4.7 Biomassa radicular – 180 DAP

A produção de raiz foi modificada pelas condições do solo e pela interação tripla dos fatores N, Mo e Bac (Tabela 7).

Para ambas as variedades, em P1 foi verificada maior quantidade de raiz, o que esteve associado a notável condição de aeração e agregação. Em P2 a quantidade de raiz foi aproximadamente 50% menor que a obtida em P1. Resultado semelhante foi observado por Cury, De Maria e Bolonhezi (2014) para o ciclo de cana soca, com predomínio de raízes nos 0,2 m iniciais e redução de mesma proporção até 0,4 m de profundidade. Em subsuperfície, os autores identificaram maior resistência à penetração em área com histórico de colheita mecanizada, como resultado da acomodação natural das partículas e do tráfego de máquinas inerentes ao manejo mecanizado da cultura.

Em subsuperfície (P2), o incremento do teor de argila e areia fina (Tabela 1) (caráter coeso) pode ter comprometido o desenvolvimento de raízes em profundidade. A coleta de

subsuperfície foi dificultada por esse adensamento, consistindo em impedimento à entrada do amostrador e ao crescimento radicular.

Tabela 7 - Biomassa seca de raiz nas profundidades P1 (0 a 0,2 m) e P2 (0,2 a 0,4 m) da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliada aos 180 dias após o plantio, em Rio Tinto - PB

		MSR P1 g dm ⁻³			MSR P2 g dm ⁻³		
RB867515							
		-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média
-Bac	-N	4,16 Aa	1,11 Bb	2,78	0,55	0,45	0,49
	+N	1,65 Bb	4,21 Aa		0,31	0,65	
+Bac	-N	1,08 Ba	2,63 ABa	1,49	0,60	0,76	0,67
	+N	1,15 Ba	1,10 Ba		0,25	1,06	
		-N	1,87	2,24	0,57 Aa	0,61 Aa	0,59
		+N	2,65	2,02	0,28 Ab	0,85 Aa	0,57
Média			2,26		0,43	0,73	
ANOVA		F			F ¹		
N		0,43 ^{ns}			0,11 ^{ns}		
Mo		0,55 ^{ns}			3,91*		
Bac		14,43 ^{***}			1,09 ^{ns}		
N*Mo		8,63 ^{**}			4,26*		
N*Bac		2,28 ^{ns}			0,32 ^{ns}		
Mo*Bac		2,17 ^{ns}			2,21 ^{ns}		
N*Mo*Bac		28,52 ^{***}			0,03 ^{ns}		
CV%		34,62			24,92		
RB92579							
		-Mo	+Mo	Média	-Mo	+Mo	Média
-Bac	-N	1,55	1,08	1,29	0,49 Aa	0,30 Aa	0,41
	+N	1,42	1,12		0,31 Aa	0,55 Aa	
+Bac	-N	1,20	1,30	1,29	0,26 Ab	0,69 Aa	0,44
	+N	1,34	1,33		0,35 Aa	0,46 Aa	
Média			1,21		0,35	0,50	
Média N		-N	1,28		0,43		
		+N	1,30		0,42		
ANOVA		F ¹			F ¹		
N		0,00 ^{ns}			0,05 ^{ns}		
Mo		0,52 ^{ns}			1,65 ^{ns}		
Bac		0,01 ^{ns}			0,00 ^{ns}		
N*Mo		0,10 ^{ns}			0,18 ^{ns}		
N*Bac		0,19 ^{ns}			0,00 ^{ns}		
Mo*Bac		1,75 ^{ns}			1,61 ^{ns}		
N*Mo*Bac		0,23 ^{ns}			3,22*		
CV%		10,39			18,74		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns}não significativo, ^{***} $p \leq 0,01$, ^{**} $p \leq 0,05$, ^{*} $p \leq 0,10$ pelo teste F. Dados transformados em $[\sqrt[3]{x}]$. MSR: massa seca de raiz. P1: profundidade 0 a 0,2 m. P2: profundidade 0,2 a 0,4 m.

Segundo Cury, De Maria e Bolonhezi (2014), a coleta ocorreu no período adequado, no final do período chuvoso e início do período de déficit hídrico, quando as raízes da cana apresentam o máximo desenvolvimento. Esses autores identificaram predomínio de raízes na entrelinha da socaria cana-de-açúcar, justificado pela maior disponibilidade de nutrientes resultante da adubação. O mesmo pôde ser verificado durante o processamento das amostras, havendo maior volume de raízes nas amostras do ponto B. Isso pode ser explicando pela

adubação de cobertura no ciclo de cana planta, e pela condição local de impedimento físico em profundidade, direcionamento o crescimento lateral.

As raízes da RB867515 tiveram a biomassa de raiz modificada pela interação tripla em P1 e pela interação N*Mo em P2 (Tabela 7). Em P1, o controle absoluto apresentou a maior massa de raiz e não diferiu do tratamento N*Mo. Em condição de deficiência de N, as plantas direcionam as reservas energéticas para o crescimento radicular em profundidade para explorar o solo na busca por nutriente. Embora o crescimento na ausência de N seja dado em profundidade, a camada de impedimento pode ter direcionado o crescimento para as laterais.

O desenvolvimento das plantas é consequência de uma relação ideal entre parte aérea e do sistema radicular. O crescimento das raízes é determinado pela genética e metabolismo das plantas, e pelas condições de solo, para aquisição e uso eficiente de recursos. Por ser um órgão heterotrófico, sua manutenção constitui em custo metabólico, de forma que o balanço inadequado da relação raiz/parte aérea pode comprometer a produção em até 45% (SMITH, INMAN-BAMBER; THORBURN, 2005; GOMATHI et al., 2015).

Cerca de 60 % das raízes da cana-de-açúcar se concentra nos primeiros 40 cm do solo, mas sob condições de solo limitantes, como ocorre na maioria dos solos brasileiros, o volume em profundidade pode ser maior (CURY, DE MARIA; BOLONHEZI, 2014).

Quando o N é disponibilizado, há estímulo do crescimento de raízes laterais (BOUGUYON; GOJON; NACRY, 2012). Na presença de Mo, a maior assimilação de nitrato intensificou a ramificação das raízes. Dessa forma, a massa de raiz obtida para o controle e N*Mo foi maior que os demais tratamentos por razões fisiológicas diferentes. O tipo de raiz desenvolvida em cada condição é um importante fator para diferenciar a eficiência de absorção de nutrientes e produção de massa seca da parte aérea (TAIZ et al., 2017). As plantas do controle tiveram menor produção de massa seca aérea do que as plantas adubadas com N e sob interação N*Mo (Tabela 6).

O crescimento radicular da RB867515 foi reduzido sob efeito isolado de N, Bac e Mo, e sob as interações N*Bac e N*Mo*Bac. Na presença de N, o crescimento da planta é estimulado, mantendo menor relação raiz/parte aérea. Nessa condição, há alocação preferencial de recursos na parte aérea, e a raiz recebe menos recurso energético e se desenvolve menos. Em plantas cultivadas, esse fenômeno explica a resposta da adubação em biomassa aérea (TAIZ et al., 2017).

O metabolismo de nitrato é correlacionado com a redistribuição de AIA nas raízes (CRAWFORD; FORDES, 2002). Em meio rico em nitrato, o AIA da raiz deixa de ser redistribuído para a parte aérea, o que estimula o crescimento da biomassa aérea. Concentrado

nas raízes, o AIA estimula a ramificação das raízes principalmente por meio da emissão de pelos radiculares (BOUGUYON; GOJON; NACRY, 2012). Dessa forma, na presença de Mo o crescimento da parte aérea se dá em resposta à concentração de nitrato e, na presença de N a massa seca de raiz torna-se menor que aquela obtida pelo tratamento controle (Tabela 7).

Bactérias diazotróficas são capazes de produzir AIA e esse mecanismo tem alto potencial contribuição para o desenvolvimento de plantas (MOHITE, 2013; LIMA et al., 2018). Alta concentração de AIA na raiz estimula a produção de pelos radiculares, responsáveis pela absorção de água e nutrientes. Dobbelaere et al. (1999) identificaram esse efeito na inoculação de *Azospirillum brasilense* em sementes de trigo. A produção de AIA pelas bactérias promoveu a produção de pelos radiculares, e a quantidade de unidades formadoras de colônia no inoculante intensificou o fenômeno. A adição de AIA sintético não mostrou a mesma intensidade de efeito obtido pela inoculação bacteriana, indicando que outros metabólitos bacterianos atuam no processo. O crescimento da parte aérea e das raízes nas plantas é controlado por um conjunto de hormônios que se autorregulam na resposta fisiológica aos estímulos ambientais (SMITH; INMAN-BAMBER; THORBURN, 2005). *A. brasilense* mostrou capacidade de produção de outros hormônios vegetais (citocinina e giberelina), que junto com o AIA promoveram crescimento efetivo (DOBBELAERE et al., 1999).

Avaliando o crescimento radicular do trigo inoculado com bactérias diazotróficas no milho, Mohite (2013) não identificou diferença do comprimento radicular das plântulas. No entanto a técnica utilizada pode não ter sido capaz de contabilizar as raízes mais finas formadas pelo estímulo do AIA (DOBBELAERE et al., 1999). A metodologia de pesagem aplicada não apresenta sensibilidade para quantificar raízes muito finas, que podem ser perdidas durante o processamento (FARONI; TRIVELIN, 2006).

Lima et al. (2018) identificaram que a bactéria é produtora de AIA pela rota dependente do triptofano, cuja síntese envolve enzima de molibdênio (MENDEL; RANCH, 2002). Os autores também identificaram menor crescimento radicular na presença da *Stenotrophomonas* sp. (UAG869) na RB867515. Dessa forma, pode-se inferir que tratamentos inoculados apresentaram menor massa de raiz pela mudança do crescimento radicular, investindo em raízes de absorção (finas), reduzindo a massa de raízes obtida.

O mesmo não pode ser aplicado à RB92579, que mostrou efeito da inoculação para outros atributos de crescimento, mas não para massa de raiz em P1. Lima et al (2018) também não identificaram modificação da massa seca de raiz na RB92579, embora tenha identificado efeito positivo da inoculação em outras variáveis de crescimento para a variedade. Em contrapartida, a média de massa seca de raiz dessa variedade foi quase duas vezes menor que a

da RB867515 (Tabela 7), diferente do que foi identificado por Lima et al. (2018), em condição de casa de vegetação. Os autores identificaram maior de massa de raízes na RB92579 do que na RB867515.

A arquitetura radicular é determinada pelo genótipo e metabolismo das plantas, e pelas condições ambientais. Diferenças do regime hídrico e umidade do solo, assim como a habilidade de responder às condições de estresse hídrico pelas plantas, irão modificar o crescimento radicular entre variedades e entre ambientes. A importância dessa mudança do crescimento das raízes está relacionada com o melhor aproveitamento dos nutrientes presentes no solo. A maior superfície específica das raízes finas (pelos radiculares) confere maior interação com o solo, e conseqüentemente, maior aproveitamento dos nutrientes do solo (FARONI; TRIVELIN, 2006; TAIZ et al., 2017). Pedula et al. (2016) verificaram que plantas inoculadas e adubadas com nitrogênio apresentaram maior acúmulo de nutrientes durante todo o ciclo de desenvolvimento. O que está relacionado à maior ramificação e produção de pelos radiculares, aumentando a exploração do solo e absorção de nutrientes.

Em P2 a massa de raízes foi maior na presença de Mo. Na RB867515, o Mo promoveu o aumento de raízes na presença de N. Na RB92579, o Mo*Bac aumentou a massa de raízes na ausência de N. O Mo foi fator de aumento da massa de raízes em subsuperfície para as duas variedades, e pode ser explicado pelo estímulo à ramificação. A camada adensada do solo levou ao espessamento radicular nessa camada em ambas as variedades, o que foi identificado durante o processamento das amostras. Há modificação no diâmetro da raiz de monocotiledôneas em condição de estresse (TAIZ et al., 2017), e a condição física pode ter favorecido o incremento de massa, em adição aos efeitos promovidos pelo Mo.

4.8 Parâmetros morfofisiológicos – 340 DAP

No final do ciclo, o nitrogênio continuou sendo o fator importante para o crescimento das variedades (Tabela 8), contribuindo para o melhor desempenho da cultura até o final do ciclo (TRIVELIN et al., 2002). As plantas adubadas com N mantiveram maior crescimento, diâmetro de colmo e produção de massa seca da parte aérea.

Na RB867515 foi o único fator de modificação do desenvolvimento da planta, perdendo-se o efeito do Mo verificado aos 140 DAP (Tabelas 5 e 6). Os ganhos da adubação nitrogenada em relação ao controle nessa fase foram de 12% em altura e 5% em diâmetro (Tabela 8). Nenhum incremento ocorreu para a produção de massa seca total. Os componentes folhas e colmos também não apresentaram diferença significativa.

Diferente desse resultado, Vieira (2015) e Oliveira (2012) observaram ganhos da adubação molíbdica para a cana-de-açúcar no final do ciclo. Vieira (2015) utilizou a variedade RB867515, avaliando o ciclo de cana planta por ser uma variedade responsiva à adubação molíbdica (BECARI, 2010). O autor verificou que doses altas podem prejudicar a produtividade de colmos, e determinou como ideais doses entre 0,6 e 1,2 kg ha⁻¹. O solo apresentava alta capacidade de adsorção de Mo, reduzindo o aproveitamento do nutriente pelas plantas. Assim, a dose de 0,4 kg em condição de solo de alta disponibilização do nutriente, pode ter impedido a obtenção de resposta mais evidente à adubação molíbdica em desenvolvimento e produtividade (Tabela 9).

Tabela 8 - Variáveis biométricas (altura de planta, diâmetro do colmo, e massa seca total) da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliadas aos 340 dias após o plantio, em Rio Tinto - PB

	Altura de planta			Diâmetro do colmo			MS total		
	cm			cm			g planta ⁻¹		
RB867515									
	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média
-N	268,5	266,1	267,3 B	2,32	2,35	2,33 B	529,7	464,2	496,9
+N	296,3	306,5	301,4 A	2,41	2,51	2,46 A	510,2	525,3	517,8
Média	282,4	286,3		2,36	2,43		520,0	494,7	
ANAVA	F ¹			F			F		
N	11,64***			3,94*			0,18 ^{ns}		
Mo	0,01 ^{ns}			0,08 ^{ns}			0,49 ^{ns}		
Bac	0,19 ^{ns}			1,33 ^{ns}			0,27 ^{ns}		
N*Mo	1,78 ^{ns}			0,64 ^{ns}			0,61 ^{ns}		
N*Bac	0,42 ^{ns}			0,31 ^{ns}			0,68 ^{ns}		
Mo*Bac	0,47 ^{ns}			1,13 ^{ns}			0,55 ^{ns}		
N*Mo*Bac	1,38 ^{ns}			0,41 ^{ns}			0,00 ^{ns}		
CV%	14,37			7,46			27,16		
RB92579									
	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média
-N	238,8	242,3	240,6 B	2,27 Aa	2,13 Ab	2,2	364,5 Aa	353,7 Ba	359,1
+N	270,8	300,2	285,5 A	2,18 Aa	2,25 Aa	2,21	359,7 Ab	444,5 Aa	402,1
Média	254,8 b	271,3 a		2,22	2,19		362,1	399,1	
ANAVA	F			F			F		
N	26,68***			0,12 ^{ns}			5,90**		
Mo	1,39 ^{ns}			1,72 ^{ns}			1,33 ^{ns}		
Bac	3,59*			0,62 ^{ns}			4,35**		
N*Mo	0,25 ^{ns}			1,42 ^{ns}			0,42 ^{ns}		
N*Bac	2,22 ^{ns}			6,67**			7,27**		
Mo*Bac	0,00 ^{ns}			0,06 ^{ns}			1,41 ^{ns}		
N*Mo*Bac	0,51 ^{ns}			0,12 ^{ns}			0,07 ^{ns}		
CV%	9,35			5,35			12,83		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns}não significativo, *** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,10$ pelo teste F. Dados transformados em $^{1/3}[\sqrt{x^3}]$. MS: massa seca. Altura medida da base do colmo à inserção da folha +1. Diâmetro medido no terço médio do colmo. MS total: MS folhas secas + MS folhas verdes + MS ponteiros + MS colmos.

Em contra partida, as plantas não adubadas mostraram avanço no desenvolvimento ao longo do ciclo, reduzindo a diferença em relação a plantas adubadas. O crescimento radicular

verificado na Tabela 7 pode ter promovido estimulado a absorção de nutrientes pela maior exploração de solo, bem como a ocorrência da FBN no decorrer do ciclo (SANTOS et al., 2019), podem ter contribuído para manutenção do crescimento dessas plantas. Enquanto as plantas adubadas com N podem ter sido limitadas pelo impedimento físico do solo, e pelo estresse hídrico maior devido à maior biomassa na fase de déficit hídrico (Tabela 8).

Enquanto na RB867515 o efeito do Mo foi verificado apenas aos 140 DAP, o efeito de N e Bac na RB92579 foram mantidos até o final do ciclo (Tabela 8). Tanto o nitrogênio quanto a bactéria continuaram atuando de forma isolada a altura das plantas e em interação na produção de massa seca total. Diferente do observado no início do desenvolvimento, a interação N*Bac influenciou o diâmetro do colmo aos 340 DAP. A inoculação reduziu o diâmetro, mas na presença de N não há efeito da inoculação. Resultado semelhante foi verificado pela interação Mo*Bac na RB867515 140 DAP.

Pedula et al. (2016) identificaram melhor desempenho da RB92579 sob inoculação bacteriana e da interação N*Bac, com efeito desses fatores ao longo do ciclo da cultura. Assim como ocorreu com a RB867515, o efeito dos tratamentos em relação ao controle foi menor que o observado ao 140 DAP. No final do ciclo, a inoculação promoveu aumento de 6% e o nitrogênio de 19% na altura das plantas. O efeito de N*Bac na produção de massa seca total aos 340 DAP foi o mesmo verificado aos 140 DAP, em que tanto a bactéria quanto a adubação nitrogenada promoveram ganho de 22% (Tabela 8).

Pedula et al. (2016) a inoculação sem adubação nitrogenada mostrou desempenho semelhante ao da interação N*Bac para as variáveis de crescimento e de nutrição. Esse resultado pode ser devido à contribuição do N do solo ou pela inoculação de mix de bactérias, que combina diferentes mecanismos de promoção de crescimento. A interação N*Bac promoveu melhor desenvolvimento da variedade mesmo utilizando apenas uma bactéria. O fornecimento de N em dose baixa (menor que a exigida pela cultura) associada com inoculação promove ganhos no desenvolvimento da cultura devido ao melhor desempenho das bactérias diazotróficas inoculadas e nativas, na realização os mecanismos promotores de crescimento (PEDULA et al., 2016; PEREIRA et al., 2018; SCHULTZ et al., 2017; ZENG et al., 2016). A inoculação bacteriana mostra-se uma ferramenta de manejo para melhor desenvolvimento da RB92579, em relação ao manejo atual da variedade (60 kg ha⁻¹ de N).

4.9 Produtividade e atributos agroindustriais

O nitrogênio foi o único fator de aumento da produção de colmos (TCH) e de açúcar (TPH) para as duas variedades (Tabela 9), de forma que o nutriente tem importante papel na produção de cana-de-açúcar no primeiro ciclo.

Tabela 9 - Produção de colmos (TCH) e produção de açúcar (TPH) da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliadas no final do ciclo, em Rio Tinto - PB

	TCH Mg ha ⁻¹			TPH kg ha ⁻¹		
RB867515						
	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média
-N	71,76	70,24	71,00 B	10,99	10,42	10,71 B
+N	81,43	81,8	81,62 A	12,5	13,09	12,79 A
Média	76,59	76,02		11,74	11,75	
ANOVA	F			F		
N	10,44***			8,01***		
Mo	0,07 ^{ns}			0,03 ^{ns}		
Bac	0,03 ^{ns}			0,00 ^{ns}		
N*Mo	1,00 ^{ns}			0,01 ^{ns}		
N*Bac	0,08 ^{ns}			0,63 ^{ns}		
Mo*Bac	0,15 ^{ns}			0,00 ^{ns}		
N*Mo*Bac	0,19 ^{ns}			0,00 ^{ns}		
CV%	12,18			16,67		
RB92579						
	-Bac	+Bac	Média	-Bac	+Bac	Média
-N	76,73	72,71	74,72 B	11,66	11,84	11,75 B
+N	96,88	93,84	95,36 A	15,65	15,61	15,63 A
Média	86,81	83,27		13,66	13,72	
ANOVA	F			F		
N	36,12***			3,31***		
Mo	1,76 ^{ns}			0,16 ^{ns}		
Bac	1,06 ^{ns}			0,01 ^{ns}		
N*Mo	0,51 ^{ns}			0,66 ^{ns}		
N*Bac	0,02 ^{ns}			0,03 ^{ns}		
Mo*Bac	0,08 ^{ns}			0,10 ^{ns}		
N*Mo*Bac	1,43 ^{ns}			1,23 ^{ns}		
CV%	11,42			12,33		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns}não significativo, *** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,10$ para teste F. TCH: toneladas de colmo por hectare. TPH: toneladas de pol por hectare.

A adubação nitrogenada aumentou a produção de colmos em 10,62 Mg ha⁻¹ na RB867515. O incremento observado para RB92579 foi maior (20,64 Mg ha⁻¹), evidenciando a maior exigência e resposta da variedade à adubação nitrogenada (OLIVEIRA et al., 2016). O mesmo ocorreu para a produção de açúcar, com incrementos de 2,08 kg ha⁻¹ e 3,88 kg ha⁻¹, respectivamente. O efeito do N sobre a produção de massa seca e fotossíntese resulta em maior produção de colmos, e produção e acúmulo de açúcar (TAIZ et al., 2017).

Diferente do que foi observado por Santos et al. (2018b) e Vieira (2015), não houve efeito do Mo na produtividade de ambas as variedades. O que pode ser atribuído à dose de Mo, que pode ter sido alta para a cultura. Segundo Vieira (2015), a dose elevada de Mo pode reduzir a

produtividade da cana-de-açúcar. Santos et al. (2018b) utilizou dose inferior (0,2 kg ha⁻¹), definida por Oliveira (2012) para maior eficiência da nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar. Nesses trabalhos a dose de Mo aumentou a produtividade da cana planta.

Na RB92579, o efeito da inoculação sobre o crescimento aos 340 DAP não resultou em incremento de produtividade. Pereira et al. (2018) verificaram efeito da inoculação combinada com a adubação com N na produtividade.

O impedimento físico do solo pode ter sido um fator limitante para o desenvolvimento das plantas de melhor desenvolvimento no final do ciclo da cana planta, anulando os efeitos de Mo e Bac sobre a produtividade.

Para aos atributos agroindustriais da cana-de-açúcar, o fator de variação foi apenas a adubação nitrogenada, aumentando a qualidade industrial da cana-de-açúcar no ciclo de cana planta (Tabela 10). Santos et al. (2018b) não observou efeito da adubação molíbdica sobre os atributos agroindustriais nas variedades, que foi modificada apenas pela aplicação de N.

Tabela 10 – Atributos agroindustriais da cana planta (RB867515 e RB92579), avaliados no final do ciclo, em Rio Tinto - PB

	POL ----- % -----	AR ----- % -----	ATR kg Mg ⁻¹	Fibra ----- % -----	PC ----- % -----	Brix
RB867515						
-N	18,01 B	0,75	143,8	13,25	14,93	17,10
+N	18,89 A	0,72	150,1	13,29	15,64	17,82
ANAVA	F	F	F	F	F	F
N	3,62*	0,70 ^{ns}	2,60 ^{ns}	0,01 ^{ns}	2,59 ^{ns}	2,91 ^{ns}
Mo	0,09 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,22 ^{ns}
Bac	0,02 ^{ns}	0,05 ^{ns}	0,19 ^{ns}	2,77 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,17 ^{ns}
N*Mo	1,89 ^{ns}	0,08 ^{ns}	1,80 ^{ns}	0,17 ^{ns}	1,70 ^{ns}	2,23 ^{ns}
N*Bac	0,03 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,34 ^{ns}	1,55 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,27 ^{ns}
Mo*Bac	0,71 ^{ns}	0,52 ^{ns}	0,61 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,49 ^{ns}	1,05 ^{ns}
N*Mo*Bac	1,11 ^{ns}	2,87 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,38 ^{ns}
CV%	6,60	14,21	7,02	10,40	7,60	6,39
RB92579						
-N	19,32	0,68 A	152,3 B	13,60 A	15,91 B	18,01
+N	19,90	0,60 B	158,7 A	12,68 B	16,66 A	18,58
ANAVA	F	F	F	F	F	F
N	1,83 ^{ns}	4,37*	3,31*	6,62**	3,65*	2,12 ^{ns}
Mo	0,67 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,50 ^{ns}	0,29 ^{ns}
Bac	0,71 ^{ns}	0,27 ^{ns}	1,15 ^{ns}	1,28 ^{ns}	1,15 ^{ns}	1,08 ^{ns}
N*Mo	0,03 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,77 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,03 ^{ns}
N*Bac	0,55 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,76 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,73 ^{ns}	0,80 ^{ns}
Mo*Bac	0,11 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,17 ^{ns}
N*Mo*Bac	0,39 ^{ns}	0,65 ^{ns}	0,12 ^{ns}	1,11 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,32 ^{ns}
CV%	5,91	16,88	5,96	7,25	6,36	5,67

Médias seguidas da mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,10$). ^{ns} não significativo, *** $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,10$ para teste F. POL: porcentagem de sacarose aparente no caldo. AR: porcentagem de açúcares redutores do caldo. ATR: açúcar total recuperável. PC: porcentagem de sacarose aparente no colmo. BRIX: teor de sólidos solúveis.

Na RB867515, o nitrogênio mostrou efeito apenas para o POL, aumentando a sacarose do caldo. A RB92579 mostrou resposta da adubação nitrogenada para quatro dos seis atributos avaliados. O nitrogênio reduziu os açúcares redutores e o teor de fibra, e aumentou a sacarose do colmo e ART, o que indica melhor qualidade industrial.

O ganho em ATR na RB92579 com adição de N foi de 5,4 kg Mg⁻¹ de colmo. Na RB867515 a adição de N aumentou o ART em 6,3 kg Mg⁻¹, mas sem diferença estatística significativa.

A RB867515 apresentou índices muito próximos aos limites estabelecidos para os atributos de qualidade (SANTOS; QUEIROZ; RABELO, 2016). O Brix ficou abaixo do ideal (>18%), com média de 17,48%. O teor médio de fibra ultrapassou em 0,27% o limite máximo de (13%), no entanto, está de acordo com o desempenho industrial da variedade (RIDESA, 2010).

5 CONCLUSÕES

A interação da adubação nitrogenada, adubação molíbdica e inoculação de bactéria diazotrófica não aumenta a fixação biológica, o crescimento da parte aérea e a produção da cana-de-açúcar de primeiro ciclo.

A adição de nitrogênio + molibdênio + bactéria aumenta o acúmulo de nitrogênio na fase inicial do desenvolvimento nas duas variedades e não é contribuição da FBN, cuja contribuição média para a cana-de-açúcar varia entre 20% e 30%, e não é modificada pelos fatores estudados.

A adubação nitrogenada aumenta o desenvolvimento da parte aérea e radicular no início e final do ciclo, a produção de colmos e de açúcar, e qualidade industrial da cana planta cultivada nos Tabuleiros Costeiros paraibanos.

A adubação molíbdica e a inoculação não modificaram a produtividade da cana planta. Esses fatores atuam de forma diferente e sistemática entre as variedades, com efeitos mais significativos no início do desenvolvimento. A reinoculação e/ou aplicação de Mo na fase de máximo crescimento da planta pode ser uma alternativa de manejo para aumentar a resposta positiva ao longo do ciclo.

A fixação biológica não é o mecanismo que modifica o desenvolvimento da cana planta, direcionando outros estudos para identificação de quais mecanismos de promoção do crescimento realizados por bactérias nativas e/ou inoculadas, podem ser estimulados pela adubação molíbdica e/ou nitrogenada, promovendo o crescimento da cana planta. Tendo em vista que o acompanhamento aos 40, 60 e 90 DAP, por meio de avaliação visual, permitiu identificar efeito da interação tripla no desenvolvimento inicial acelerado e na produção de biomassa aérea.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA EXECUTIVA DE GESTÃO DE ÁGUAS. GOVERNO DA PARAÍBA. GEO AESA. Disponível em <<http://www.siegrh.aesa.pb.gov.br>> Acesso: janeiro, 2020.

AHMED, A.; HASNAIN, S. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 63, n. 3, p. 261-266, 2014.

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; GONÇALVES, J. L. de M.; SPAROVEK, G. Koppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, v. 22, n 6, p 711-728, 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>

AMUNDSON, R.; AUSTIN, A. T.; SCHUUR, E. A.; YOO, K.; MATZEK, V.; KENDALL, C.; UEBERSAX, A.; BRENNER, D.; BAISDEN, W. T. Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 17, n. 1, a1031, p. 1-5, 2003. <https://doi.org/10.1029/2002gb001903>

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. **Annal of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 91, n. 4, e20180990, p. 1-12, 2019. <https://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, 2017. <https://doi.org/10.4238/gmr16029662>

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

ARMAS, R. de; VALADIER, M.-H.; CHAMPINGNY, M.-L.; LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, v. 140, p. 531-535, 1992. [https://doi.org/10.1016/s0176-1617\(11\)80783-2](https://doi.org/10.1016/s0176-1617(11)80783-2)

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DOBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(96\)00218-0](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(96)00218-0)

BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; DOBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane - reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, v. 29, n. 4, p. 417-423, 2002. <https://doi.org/10.1071/pp01083>

BARRON, A. R.; WURZBURGER, N.; BELLENGER, J. P.; WRIGHT, S. J.; KRAEPIEL, A. M. L.; HEDIN, L. O. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. **Nature Geoscience**, v.2, p. 42-45, 2008. <https://doi.org/10.1038/ngeo366>

BARROS, B. G. de F.; FREITAS, A. D. S. de; TABOSA, J. N.; LYRA, M. do C. C. P. de; MERGULHÃO, A. C. do E. S.; SILVA, A. F. da; OLIVEIRA, W. da S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; SAMPAIO, E. V. de S. B. Biological nitrogen fixation in field-grown sorghum under different edaphoclimatic conditions is confirmed by N isotopic signatures. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10705-020-10051-3>

BECARI, G. R. G. **Resposta da cana-planta à aplicação de micronutrientes**. (2010). 72f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2010.

BELLENGER, J. P.; WICHARD, T.; KUSTKA, A. B.; KRAEPIEL, M. L. Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. **Nature Geoscience**, v. 1, n. 4, p. 243-246, 2008. <https://doi.org/10.1038/ngeo161>

BODDEY, R. M. Biological nitrogen fixation in sugarcane: a key to energetically viable biofuel production. **Critical Reviews in Plant Sciences**. v. 14, n. 3, p. 263-279, 1995. <https://doi.org/10.1080/07352689509701929>

BODDEY, R. M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Use of the ¹⁵N natural abundance technique for the quantification of the contribution of N₂ fixation to sugar cane and other grasses. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 889-895, 2001. <https://doi.org/10.1071/pp01058>

BODDEY, R. M.; URQUIANA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**. v. 252, p. 139-149, 2003. <https://doi.org/10.1023/a:1024152126541>

BORDONAL, R. de O.; CARVALHO, J. L.N.; LAL, R.; FIGUEIREDO, E. B. de; OLIVEIRA, B. G. de; LA SCALA JR, N. Sustainability of sugarcane production in Brazil. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 38, n. 13, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13593-018-0490-x>

BOSCHIERO, B. N.; MARIANO, E.; AZEVEDO, R. A.; TRIVELIN, P. C. O. Influence of nitrate-ammonium ratio on the growth, nutrition, and metabolism of sugarcane. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 246-255, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.024>

BOUGUYON, E.; GOJON, A.; NACRY, P. Nitrate sensing and signaling in plants. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 23, p. 648-654, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.004>

BOYD, E. S.; HAMILTON, T. L.; PETERS, J. W. An alternative path for the evolution of biological nitrogen fixation. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 205, p. 1-11, 2011. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00205>

BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Energético. Balanço Energético Nacional – ano base 2017. PDF. Empresa de Pesquisa Energética – EPE, Rio de Janeiro, 2018.
Disponível em: <<http://www.mme.gov.br>>. Acessado em: fevereiro de 2020.

BROWN, L.; SCHOLEFIELD, D.; JEWKES, E. C.; PREEDY, N.; WADGE, K.; BUTLER, M. The effect of sulphur application on the efficiency of nitrogen use in two contrasting grassland soils. **Journal of Agriculture Science**, v. 135, p.131-138 2000.
<https://doi.org/10.1017/s0021859699008072>

CALDARELLI, C. E.; GILIO, L. Expansion of the sugarcane industry and its effects on land use in São Paulo: Analysis from 2000 through 2015. **Land Use Policy**, v. 76, p. 264-274, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.05.008>

CALHEIROS, L. C. S.; FREIRE, F. J.; FILHO, G. M.; OLIVEIRA, E. C. A.; MOURA, A. B.; COSTA, J. V. T.; CRUZ, F. J. R.; SANTOS, A. S.; REZENDE, J. S. Assessment of nutrient balance in sugarcane using DRIS and CND methods. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 9, p. 164-179, 2018. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n9p164>

CAPAZ, R. S.; CARVALHO, V. S. B.; NOGUEIRA, L. A. H. Impact of mechanization and previous burning reduction on GHG emissions of sugarcane harvesting operations in Brazil. **Applied Energy**, v. 102, p 220-228, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.09.049>

CARVALHO, T. L. G.; BALSEMÃO-PIRES, E.; SARAIVA, R.M.; FERREIRA, P. C. G.; HEMERLY, A.S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 5631–5642, 2014.
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>

CARVALHO, E. X. de; MENEZES, R. S. C.; FREITAS, A. D. S. de; SAMPAIO, E. V. de S. B.; SIMÕES NETO, D. E.; TABOSA, J. N.; PRIMO, D. C.; QUEIROZ, R. O. The ¹⁵N natural abundance technique to assess the potential of biological nitrogen fixation (BNF) in some important C4 grasses. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 12, p. 1559-1564, 2017. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.12.pne729>

CHARTER, R. A.; TABATABAI, M. A.; SCHAFER, J. W. Arsenic, molybdenum, selenium, and tungsten contents of fertilizers and phosphate rocks. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 26:17-18, p. 3051-3062, 1995.
<https://doi.org/10.1080/00103629509369508>

CHENG, M.; LI, C.; ZHOU, L.; XIE, S. Mo marine geochemistry and reconstruction of ancient ocean redox states. **Science China: Earth Sciences**, v. 58, p. 1-11, 2015.
<https://doi.org/10.1007/s11430-015-5177-4>

CURY, T. N.; DE MARIA, I. C.; BOLONHEZI, D. Biomassa radicular da cultura de cana-de-açúcar em sistema convencional e plantio direto com e sem calcário. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 1929-1938, 2014. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832014000600027>

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Portal de Informações agropecuárias. Safras. Cana-de-açúcar – Série Histórica. Última safra (2019/20). Disponível em: <www.portaldeinformacoes.conab.gov.br> Acessado em: fevereiro de 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Acompanhamento da safra Brasileira. Boletim da Safra de Cana-de-açúcar. Safra 2019/20. Terceiro levantamento, dezembro de 2019. v. 6, n. 3. 58f. Brasília, DF: 2019. Disponível em: <www.conab.gov.br> Acessado em: fevereiro de 2020.

CRAWFORD, N. M.; FORDE, B. G. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. **The Arabidopsis Book**, v. 1, e0011, p. 1-25, 2002. <https://doi.org/10.1199/tab.0011>

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, p. 155-164, 1999. <https://doi.org/10.1023/a:1004658000815>

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. ed. téc. Humberto Gonçalves dos Santos. 5ª ed. revista e ampliada – Embrapa Informação Tecnológica. 532 p. Brasília, DF: 2018.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solo**. ed. téc. Paulo Cesar Teixeira. 3ª ed. revista e ampliada – Embrapa Informação Tecnológica. 573 p. Brasília, DF: 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de análises químicas de solo, plantas e fertilizantes**. ed. téc. Fábio Cesar da Silva. 2ª ed. revista e ampliada – Embrapa Informação Tecnológica. 627 p. Brasília, DF: 2009.

FARONI, C. E.; TRIVELIN, P. C. O. Quantificação de raízes metabolicamente ativas na cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 1007-1013, 2006. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2006000600017>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. FAOSTAT. Rankings. 2017. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat>> Acessado em: fevereiro de 2020.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Stalk yield and technological attributes of planted cane as related to nitrogen fertilization. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 5, p. 579-590, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0103-90162010000500012>

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29-41, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2010.11.011>

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. de S. B.; RAMOS, A. P. de S. R.; BARBOSA, M. R. de V.; LYRA, R. P.; ARAÚJO, E. L. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rainfall gradient in Northeast Brazil. **Plant and Soil**, v. 391, n. 1–2, p. 109–122, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2417-5>

FOWLER, D.; COYLE, M.; SKIBA, U.; SUTTON, M. A.; CAPE, J. N.; REIS, S.; SHEPPARD, L. J.; JENKINS, A.; GRIZZETI, B.; GALLOWAY, J. N.; VITOUSEK, P.; LEACH, A.; BOUWMAN, A. F.; BUTTERBACH-BAHL, K.; DENTENER, F.; STEVENSON, D.; AMANN, M.; VOSS, M. The global nitrogen cycle in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, Series B, Biological Sciences, v. 368, n. 1621, p. 1–12, 2013. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>

GÍRIO, L. A. da S.; DIAS, F. L. F.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; SCHULTZ, N.; BOLONHEZI, D.; MUTTON, M. A. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.50, n.1, p. 33-43, 2015. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2015000100004>

GLASS, J.B.; AXLER, R.P.; CHANDRA, S.; GOLDMAN, C.R. Molybdenum limitation of microbial nitrogen assimilation in aquatic ecosystems and pure cultures. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, a331, 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00331>

GOMATHI, R.; RAO, P. N. G.; CHANDRAN, K.; SELVI, A. Adaptive responses of sugarcane waterlogging stress: an over view. **Sugar Tech**, v. 17, n. 4, p. 325-339, 2015. <https://doi.org/10.1007/s12355-014-0319-0>

GONZAGA, L. C.; CARVALHO, J. L. N.; OLIVEIRA, B. G. de; SOARES, J. R.; CANTARELLA, H. Crop residue removal and nitrification inhibitor application as strategies to mitigate N₂O emissions in sugarcane fields. **Biomass and Bioenergy**, v. 199, p. 206-216, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.015>

GOSAL, S. K.; KALIA, A.; UPPAL, S. K.; KUMAR, R.; WALIA, S. S.; SINGH, K.; SINGH, H. Assessing the benefits of *Azotobacter* bacterization in sugarcane: a field appraisal. **Sugar Tech**, v. 14, n. 1, p. 61–67, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12355-011-0131-z>

GRASSI, M. C. B.; PEREIRA, G. A. G. Energy-cane and RenovaBio: Brazilian vectors to boost the development of biofuels. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 201-205, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.006>

GUHA, A. K.; PHUKAN, A. K. Why vanadium complexes perform poorly in comparison to related molybdenum complexes in the catalytic reduction of dinitrogen to ammonia (schrock cycle): A theoretical study. **Inorganic Chemistry**. v. 50, n 18, p. 8826-8833, 2011. <https://doi.org/10.1021/ic200765s>

HAMLIN, R. L. Molybdenum. In: BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. (eds.) **Handbook of plant nutrition**. p. 375-394. London: Taylor e Francis, 2007.

HELZ, G. R.; VORLICEK, T. P. Precipitation of molybdenum from euxinic waters and the role of organic matter. **Chemical Geology**, v. 509, p. 178-193, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2019.02.001>

HOGBERG, P. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, v. 137, n. 2, p. 179-203, 1997. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00808.x>

INSELSBACHER, E.; WANEK, W.; STRAUSS, J.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S.; MULLER, C. A novel ^{15}N tracer model reveals: plant nitrate uptake governs nitrogen transformation rates in agricultural soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 57, p. 301-310, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.10.010>

INSTITUTO AGRONÔMICO DE PESQUISA. **Recomendações de adubação para o Estado de Pernambuco: 2a. aproximação**. Francisco José de Albuquerque Cavalcanti. (coord.) 3ª ed. – IPA. 212 p. Recife, PE: 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Cidades e Estados. Rio Tinto – PB. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/pb/rio-tinto.html>> Acesso: janeiro, 2020.

IQBAL, E. A.; IQBAL, K. Effect of different nitrogen and phosphorus levels quantitative e qualitative traits of sugarcane. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 240 – 241, 2001. <https://doi.org/10.3923/jbs.2001.240.241>

JACOBY, R.; PEUKERT, M.; SUCCURRO, A.; KOPRIVOVA, A.; KOPRIVA, S. The role of soil microorganisms in plant mineral nutrition – current knowledge and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, a:1617, p. 1-19, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01617>

JADOSKI, C. J.; TOPPA, E. V. B.; JULIANETTI, A.; HULSHOF, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Physiology development in the vegetative stage of sugarcane. **Applied Research and Agrotechnology**, v. 3, n. 2, p. 177-185, 2010. <https://doi.org/10.5777/paet.v3i2.1064>

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

KAISER, B. N.; GRIDLEY, K. L.; BRADY, J. N.; PHILLIPS, T.; TYERMAN, S. D. The role of molybdenum in agricultural plant production. **Annals of Botany**, v. 96, n. 5, p. 745-754, 2005. <https://doi.org/10.1093/aob/mci226>

KOÇAR, G.; CIVAS, N. An overview of biofuels from energy crops: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v, 28, p 900-916, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.08.022>

KRAEMER, S. M.; DUCKWORTH, O. W.; HARRINGTON, J. M.; SCHENKEVELD, W. D. C. Metallophores and trace metal biogeochemistry. **Aquatic Geochemistry**, v. 21, p. 159-195, 2015. <https://doi.org/10.1007/s10498-014-9246-7>

KUZYAKOV, Y. Priming effects: Interactions between living and dead organic matter. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1363-1371, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.04.003>

LEAL, M.R.L.V.; WALTER, A.S.; SEABRA, J.E.A. Sugarcane as an energy source. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 3, p. 17-26, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13399-012-0055-1>

LIERMANN, L. J.; GUYNN, R. L.; ANBAR, A.; BRANTLEY, S. L. Production of a molybdophore during metal-targeted dissolution of silicates by soil bacteria. **Chemical Geology**, v. 200, n. 3-4, p. 285-302, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chemgeo.2005.04.013>

LIMA, D. R. M. de; SANTOS, I. B. dos; OLIVEIRA, J. T. C. O.; BARBOSA, J. G.; DINIZ, W. P. da S.; FARIAS, A. R. B. de; FREIRE, F. J.; KUKLIMSKY SOBRAL, J. 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>

LIU, X.-J. A.; GROENIGEN, K. J. van; DIJKSTRA, P.; HUNGATE, B. A. Increased plant uptake of native soil nitrogen following fertilizer addition – not a priming effect? **Applied Soil Ecology**, v. 114, p. 105-110, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.03.011>

LUO, S.; YU, L.; LIU, Y.; ZHANG, Y.; YANG, W.; LI, Z.; WANG, J. Effects of reduced nitrogen input on productivity and N₂O emissions in a b m system. **European Journal of Agronomy**, v. 81, p. 78-85, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2016.09.002>

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>

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed., 319 p. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1997.

MARAFON, A. C. **Análise quantitativa de crescimento em cana-de-açúcar: uma introdução ao procedimento prático**. Documento 168. 29 p. Aracaju, Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012.

MARCOS, F. C. C.; IÓRIO, R. de P. F.; SILVEIRA, A. P. D. da; RIBEIRO, R. V.; MACHADO, E. C.; LAGÔA, A. M. M. de A. Endophytic bacteria affect sugarcane physiology without changing plant growth. **Bragantia**, Campinas, v. 75, n. 1, p. 1-9, 2015. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.256>

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant**, v. 45, n. 3, p. 372-381, 2009. <https://doi.org/10.1007/s11627-009-9220-z>

MEHMOOD, U.; INAM-UL-HAQ, M.; SAEED, M.; ALTAF, A.; AZAM, F. A brief review on plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a key role in plant growth promotion. **Plant Protection**, Islamabad, v. 2, n. 2, p. 77-82, 2018.

MELLIS, E. V.; QUAGGIO, J. A.; BECARI, G. R. G.; TEIXEIRA, L. A. J.; CANTARELLA, H.; DIAS, F. L. F. Effect of micronutrients soil supplementation on sugarcane in different production environments: cane plant cycle. **Soil Fertility and Crop Nutrition**, v. 108, n. 5, p. 2060-2070, 2016. <https://doi.org/10.2134/agronj2015.0563>

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

MENDEL, R. R.; HANSCH, R. Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 375, p. 1689-1698, 2002. <https://doi.org/10.1093/jxb/erf038>

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638-649, 2013. <http://doi.org/10.4067/s0718-95162013005000051>

MORAES, M. A. F. D. de; BACCHI, M. R. P.; CALDARELLI, C. E. Accelerated growth of the sugarcane, sugar, and ethanol sectors in Brazil (2000–2008): Effects on municipal gross domestic product *per capita* in the south-central region. **Biomass and Bioenergy**, v. 91, p. 116-125, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2016.05.004>

OLIVER, R. **Interação entre bactérias diazotróficas e doses de N-fertilizante na cultura da cana-de-açúcar**. 2014. 61f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

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, 2018. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1425436>

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

OLIVEIRA, E. C. A.; GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OTTO, R.; FRANCO, H. C. J. Determining a critical nitrogen dilution curve for sugarcane. **Journal of Plant Nutrition**, v. 176, n. 5, p. 712-723, 2013. <https://doi.org/10.1002/jpln.201200133>

OLIVEIRA, E. C. A. de; FREIRE, J. F.; OLIVEIRA, R. I.; FREIRE, M. B. G. dos S.; SIMÕES NETO, D. E.; SILVA, S. A. M. da. Extração e exportação de nutrientes por variedades de cana-de-açúcar cultivadas sob irrigação plena. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1343-1352, 2010. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832010000400031>

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

OLIVEIRA, J. A. P. de. The policymaking process for creating competitive assets for the use of biomass energy: the Brazilian alcohol programme. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 6, p. 129-140, 2002. [https://doi.org/10.1016/s1364-0321\(01\)00014-4](https://doi.org/10.1016/s1364-0321(01)00014-4)

OTTO, R.; CASTRO, S. A. Q.; MARIANO, E.; CASTRO, S. G. Q.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O. Nitrogen use efficiency for sugarcane-biofuel production: what is next? **Bioenergy Research**, v. 9, p. 1272–1289, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12155-016-9763-x>

OTTO, R.; FRANCO, H. C. J.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O. Fitomassa de raízes e da parte aérea da cana-de-açúcar relacionada à adubação nitrogenada de plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 4, p. 398-405, 2009. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2009000400010>

OTTO, R.; FREITAS JÚNIOR, J. C. M. de; ZAVASCHI, E.; FARIA, I. K. P. de; PAIVA, L. A.; BAZANI, J. H.; MIRA, A. B. de; KAMOGAWA, M. Y. Combined application of concentrated vinasse and nitrogen fertilizers in sugarcane: strategies to reduce ammonia volatilization losses. **Sugar Tech**, v. 19, p. 248-257, 2017. <https://doi.org/10.1007/s12355-016-0463-9>

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>

PANKIEVICZ, V. C. S.; AMARAL, F. P. do; SANTOS, K. F. D. N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M. J.; ARISI, A. C. M.; STEFFENS, M. B. R.; SOUZA, E. M. de; PEDROSA, F. O.; STACEY, G.; FERRIERI, R. A. Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907-919, 2015. <https://doi.org/10.1111/tpj.12777>

PEDULA, R. O.; SCHULZ, N.; MONTEIRO, R. C.; PEREIRA, W.; ARAÚJO, A. P. de; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. R. Growth analysis of sugarcane inoculated with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 30, p. 2786-2795, 2016. <https://doi.org/10.5897/ajar2016.1114>

PEREIRA, W.; LEITE, J. M.; HIPOLITO, G. de S.; SANTOS, C. R. L. dos; 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. <http://doi.org/10.1590/s1806-66902013000200020>

PEREIRA, W.; SOUSA, J. S.; SCHULTZ, N.; REIS, V. M. Sugarcane productivity as a function of nitrogen fertilization and inoculation with diazotrophic plant growth-promoting bacteria. **Sugar Tech**, v. 21, p. 71-82, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12355-018-0638-7>

REICH, P. B.; ELLSWORTH, D. S.; WALTERS, M. B. Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis – nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. **Functional Ecology**, v. 12, p. 948-958, 1998. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00274.x>

REIS, S.; BEKUNDA, M.; HOWARD, C.; KARANJA, N.; WINIWARTER, W.; YAN, X.; BLEEKER, A.; SUTTON, M. A. Synthesis and review: Tackling the nitrogen management challenge: from global to local scales. **Environmental Research Letters**, v. 11, p. 1-13, 2016. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/11/12/120205>

REIS, V. M.; JESUS, E. da C.; STEFAN, S.; OLIVEIRA, A. L. de M. de; OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. de; SANTOS, L. A. (eds). **Nutrição Mineral de Plantas**. 2 ed. Viçosa: SBCS, 2018, p. 280-307.

REIS JUNIOR, R. dos A.; MONNERAT, P. H. DRIS norms validation for sugarcane crop. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 379-385, 2003. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2003000300007>

RIDESA - Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do Setor Sucroenergético. **Catálogo nacional de variedades 'RB' de cana-de-açúcar**. 140 p. RIDESA, Curitiba, 2010.

RIDESA - Rede Interuniversitária para o desenvolvimento do Setor Sucroenergético. Censo varietal Brasil 2017/18. Disponível em: <<https://www.ridesa.com.br/censo-varietal>>. Acesso em: janeiro de 2020.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; VINALL, K.; SOPER, F.; HOLST, J.; GAMAGE, H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAM, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **Plos One**, v. 6, n. 4, e19045, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019045>

ROCHA, I. T. M. da. **Nutrição, aspectos fisiológicos e produtividade de cana-de-açúcar sob fertilização potássica**. 2017. 156f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

SANTOS, C. L. R.; 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, p. 384–394, 2014. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2014000500008>

SANTOS, F.; QUEIROZ, J. H.; RABELO, S. C. Qualidade da cana-de-açúcar para processamento industrial. In: SANTOS, F.; BORÉM, A. (eds.). **Cana-de-açúcar do plantio à colheita**. Viçosa: UFV, 2016, p. 277-290.

SANTOS, M. B. da C. **Características químicas de solo e planta e fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar em municípios do semiárido pernambucano**. 2018. 97f. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Departamento de Energia Nuclear, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

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. C.; 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, 2018a. <https://doi.org/10.1080/00103624.2017.1421648>

SANTOS, R. L. dos; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, E. C. A. de; SIMÕES NETO, D. E.; MEDEIROS, M. R. F. A. de; BEZERRA, P. da C.; MOURA, M. J. A. de; BARBOSA, J. de A.; LOPES, N. R. da C.; SANTOS, N. de L. Productivity and technological quality of sugarcane under fertilization of nitrogen and molybdenum. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 18, n. 4, p. 1002-1020, 2018b. <http://doi.org/10.4067/s0718-95162018005002901>

SANTOS, R. L. dos; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, E. C. A. de; FREIRE, M. B. G. dos 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 Ciência do Solo**, v. 43, p. 1-19, 2019a. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20180171>

SANTOS, R. L. dos; FREIRE, F. J.; OLIVEIRA, E. C. A. de; TRIVELIN, P. C. O.; FREIRE, M. B. G. dos S.; BEZERRA, P. da C.; OLIVEIRA, R. I.; SANTOS, M. B. da C. Changes in biological nitrogen fixation and natural-abundance N isotopes of sugarcane under molybdenum fertilization. **Sugar Tech**, v. 21, p. 925-935, 2019b. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00717-w>

SANTOS, S. G. dos; RIBEIRO, F. da S.; FONSECA, C. S. da; 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, p. 863–873, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1357-2>

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F. de; 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 ^{15}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.; PEREIRA, W.; SILVA, P. de A.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 366-374, 2017. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2017.1374869>

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. S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, p. 407-414, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832014000200005>

SEABRA, J. E. A.; MACEDO, I. C.; CHUM, H. L.; FARONI, C. E.; SARTO, C. A. Life cycle assessment of Brazilian sugarcane products: GHG emissions and energy use. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 5, n. 5, p. 519-532, 2011. <https://doi.org/10.1002/bbb.289>

SHEARER, G.; KHOL, D. H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, n. 6, p. 699-756, 1986. <https://doi.org/10.1071/pp9860699>

SILVA, M. A. da. **Bactérias diazotróficas e adubação molíbdica na contribuição da fixação biológica de N₂ em cana planta**. 2016. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.

SILVA, A. A. da. **Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em diferentes condições edafoclimáticas do nordeste brasileiro**. 2017. 69f. Tese (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Departamento de Energia Nuclear – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017a.

SILVA, J. M. da.; SANTOS, T. M. C. dos; ALBUQUERQUE, L. S. de; MONTALDO, Y. C.; OLIVEIRA, J. U. L. de; SILVA, S. G. M. da; NASCIMENTO, M. S.; TEIXEIRA, R. da R. O. Potential of endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. and *Bacillus* spp.) to promote sugarcane growth. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore, v. 9, n. 8, p. 754-760, 2015.

SILVA, M. de O.; FREIRE, F. J.; KULINSKY-SOBRAL, J.; OLIVEIRA, E. C. A. de; FREIRE, M. B. G. dos S. APOLINÁRIO, V. X. de O. Bacteria associated with sugarcane in Northeastern Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 37, p. 1586-1594, 2016. <https://doi.org/10.5897/ajmr2016.824>

SILVA, J. A. da. The importance of the wild cane *Saccharum spontaneum* for bioenergy genetic breeding. **Sugar Tech**, v. 19, p. 1-13, 2017b. <https://doi.org/10.1007/s12355-017-0510-1>

SILVA, S. K. da. **Fixação e transferência de nitrogênio em cultivos consorciados e solteiros de gramíneas e leguminosas**. 2018. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

SIMÕES NETO, D. E.; OLIVEIRA, A. C. de; FREIRE, F. J.; FREIRE, M. B. G. dos S.; OLIVEIRA, E. C. A. de; ROCHA, A. T. da. Adubação fosfatada para cana-de-açúcar em solos representativos para o cultivo da espécie no Nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 1, p. 73-81, 2015. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2015000100008>

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J. Growth and function of the sugarcane root system. **Fields Crop Research**, v. 92, n. 1-2, p. 169-183, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2005.01.017>

SOUZA ANTONIO, C. de; ROUWS, L. F. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V. M. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 4, p. 272-280, 2016. <https://doi.org/10.5039/agraria.v11i4a5393>

SOUZA JUNIOR, J. G. de A.; CHERUBIN, M. R.; OLIVEIRA, B. G.; CERRI, C. E. P.; CERRI, C. C.; FEIGL, B. J. Three-year soil carbon and nitrogen responses to sugarcane straw management. **Bioenergy Research**, v. 11, p. 249-261, 2018. <https://doi.org/10.1007/s12155-017-9892-x>

SOUZA, S. R. de; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. de; SANTOS, L. A. (eds). **Nutrição Mineral de Plantas**. 2 ed. Viçosa: SBCS, 2018. p. 310-375.

SPIRONELLO, A.; RAIJ, B. van; PENATTI, C. P.; CANTARELLA, H.; MORELLI, J. L.; ORLANDO FILHO, J.; LANDELL, M. G. de A.; ROSSETO, R. Cana-de-açúcar. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. (eds). **BOLETIM TÉCNICO 100 - Recomendações de Adubação e Calagem para o Estado de São Paulo**. 2 ed. p. 237-239. Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 1997.

STOLF, R. Metodologia de avaliação de falhas nas linhas de cana-de-açúcar. STAB, Piracicaba, v. 4, n. 6, p. 22-36, 1986. Reimpressão comemorativa dos 30 anos. STAB, Piracicaba, v. 34, n. 1, p. 44-53, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6ª ed. Artmed: Porto Alegre, 2017.

TAULÉ, C. MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, v. 356, p. 35-49, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>

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>

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 10, p. 1005-1024, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2000.00595.x>

TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, M. W.; GAVA, G. J. C.; SARRIÉS, G. A. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 3, p. 637-646, 2002. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832002000300008>

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G. BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. 258 p. Camberra: ACIAR, 2008.

URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S. BODDEY, R. M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. **Soil Science Society of American Journal**, v. 56, n. 1, p. 105–114, 1992.

<https://doi.org/10.2136/sssaj1992.03615995005600010017x>

URQUIAGA, S.; LIMA, R. de M.; XAVIER, R. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. Avaliação da eficiência do processo de fixação biológica de nitrogênio em diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Agronomia**, Seropédica, v. 37, n. 1, p. 55– 58, 2003.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. de; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M. e; BARBOSA, K. P.; RESENTE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 5–21, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>

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

<https://doi.org/10.5039/agraria.v6i2a550>

VIEIRA, R. de C. **Doses e formas de aplicação de molibdênio em cana-de-açúcar**. 2015. 88f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2015.

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

<https://doi.org/10.1023/a:1004288008199>

ZANG, H.; BLAGODATSKAYA, E.; WANG, J.; XU, X.; KUZYAKOV, Y. Nitrogen fertilization increases rhizodeposit incorporation into microbial biomass and reduces soil organic matter losses. **Biology and Fertility Soils**, v. 56, p. 419-429, 2017.

<https://doi.org/10.1007/s00374-017-1194-0>

ZENG, J.; LIU, X.; SONG, L.; LIN, X.; ZHANG, H.; SHEN, C.; CHU, H. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 92, p. 41-49, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.09.018>

ZHANG, X.; McROSE, D. L.; DRNAJOUX, R.; BELLENGER, J. P.; FRANÇOIS, M. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L. Alternative nitrogenase activity in the environment and nitrogen cycle implications. **Biogeochemistry**, v. 127, p. 189-198, 2016.

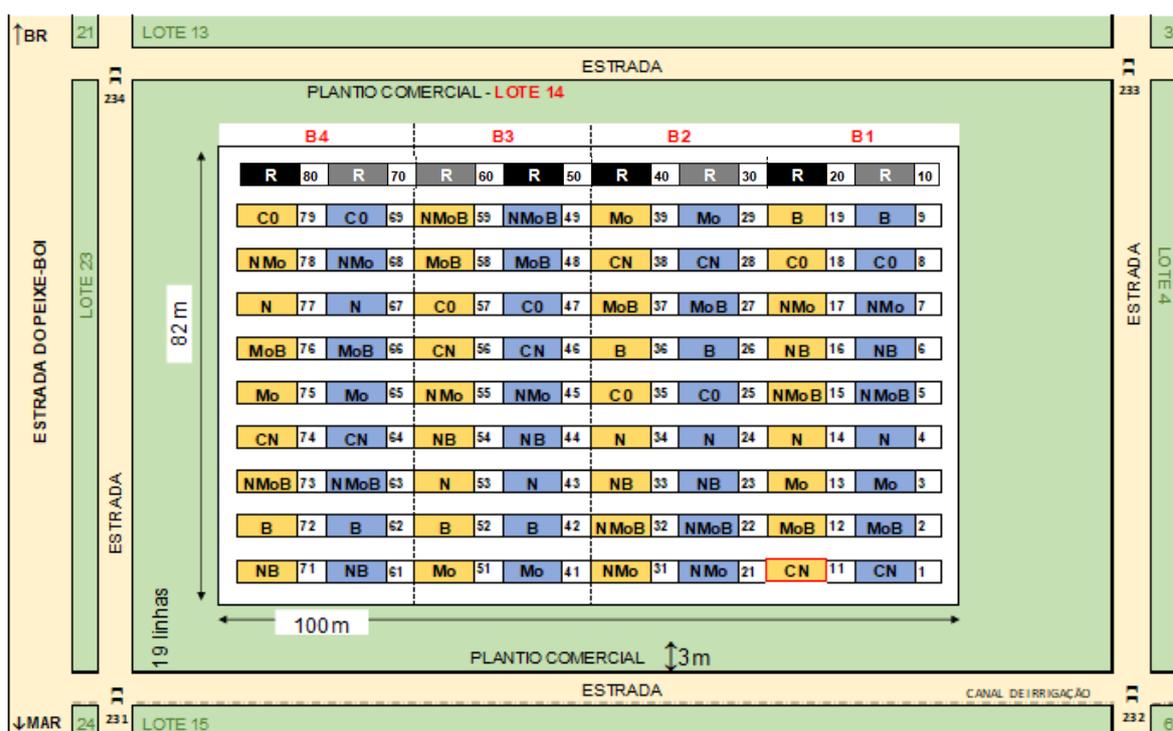
<https://doi.org/10.1007/s10533-016-0188-6>

APÊNDICE A – Croqui da área experimental

O desenho experimental em faixas foi escolhido evitar mistura de variedades durante a implantação. Optou-se por não utilizar o esquema de parcela subdividida em faixas e avaliar as variedades em separado utilizando esquema fatorial (Figura 6).

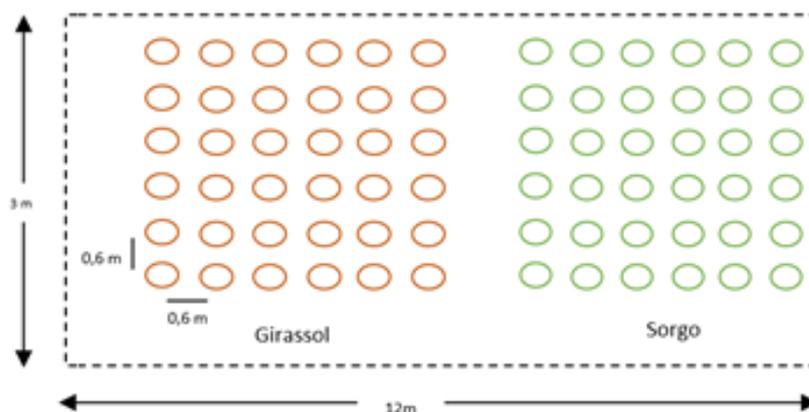
As plantas referência foram dispostas em parcelas ao final de cada bloco, contendo sorgo e girassol, plantados em covas, com espaçamento 0,6 x 0,6 m. (Figura 7).

Figura 6 – Croqui da área experimental ilustrando o delineamento experimental e distribuição das variedades RB867515 (amarelo) e RB92579 (azul), e plantas referência sem (cinza) e com (preto) adubação nitrogenada



Fonte: Autoria própria.

Figura 7 – Croqui da parcela das plantas utilizadas como referência.



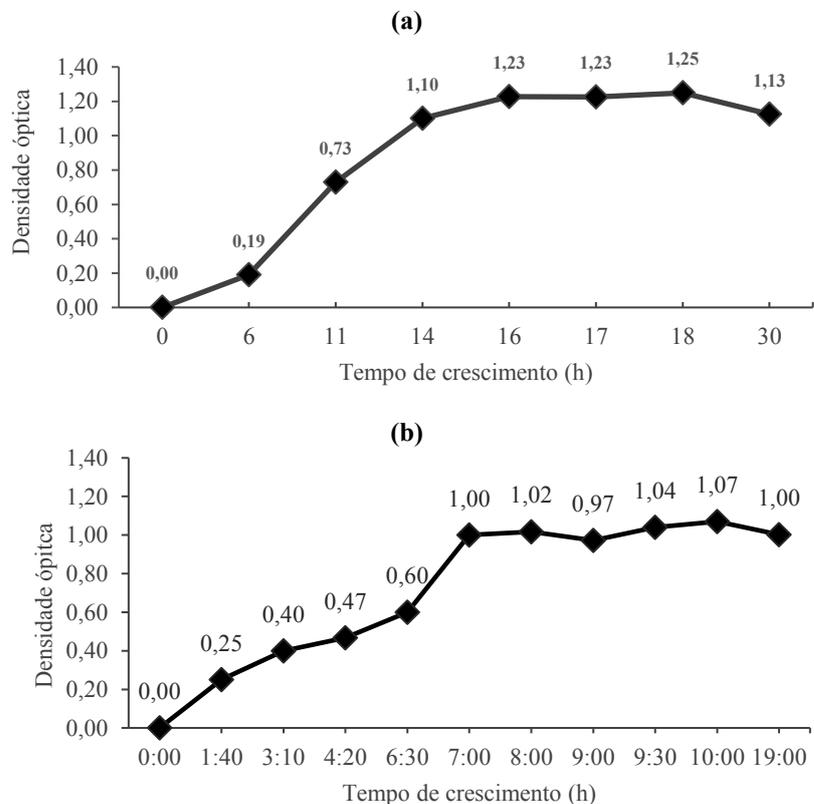
Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE B – Elaboração da curva de crescimento bacteriano

As colônias isoladas em placa de Petri com meio Tryptone Soya Agar 10% (TSA) pH 7,3 foram multiplicadas em meio TSA líquido (pré-inóculo) de 500 mL mantido sob agitação a 250 rpm. Durante a agitação foram coletadas alíquotas para leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (540 nm), e para realizar diluições seriadas em fluxo laminar. Em cada coleta foi realizado o semeio das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} em placas de Petri com meio TSA 10%, em triplicata, e incubadas por 24 horas. A contagem da população correspondeu à DO em cada coleta (tempo), formando a curva de crescimento. A população desejada de 10^9 UFC foi atingida durante a fase log do crescimento bacteriano, após 11 horas de crescimento. Após 30, a população estava em fase de morte (Figura 8a).

Após 11h de crescimento, o pré-inóculo foi transferido para fermentador com 4 L de meio TSA líquido, sob aeração forçada. A densidade óptica foi acompanhada realizando leituras da solução inoculante ao longo de 19 horas, obtendo nova curva de crescimento. Nessa curva a densidade óptica da população desejada foi atingida após 7h de crescimento (Figura 8b).

Figura 8 – Curva de crescimento bacteriano em meio de cultivo líquido de menor volume (a) e maior volume (b)



Fonte: Autoria própria.

APÊNDICE C – Preparo do inoculante

Após agitação, o pré-inóculo foi transferido do erlenmeyer para o fermentador, com auxílio de bomba dosadora motorizada (a), no Laboratório de Biologia do Solo do Instituto de Agrônomo de Pernambuco – IPA. O inoculante foi mantido sob aeração forçada por sete horas para crescimento da população bacteriana, e então transferido para os sacos vedados contendo 180 g de turfa esterilizada. 50 mL do líquido foi adicionado à turfa por meio de bomba dosadora motorizada, com auxílio de agulha. Ao final do procedimento, o orifício foi protegido com fita crepe.

Para esterilização da turfa, os pacotes vedados foram submetidos a três autoclavagens, a 120° C, por uma hora, em intervalos de 24 horas. Cada saco foi perfurado uma vez com agulha antes de serem autoclavados para evitar o rompimento da vedação dos sacos dentro da autoclave. O orifício foi protegido com fita crepe.

Figura 9 – Etapas do preparo do inoculante turfoso



Transferência do pré-inóculo



Crescimento em fermentador



Transferência para tufa

Fonte: Compilação de acervo do autor.

APÊNDICE D – Inoculação da cana-de-açúcar em campo

O preparo da solução inoculante em campo iniciou as 06:00 horas da manhã, e a primeira imersão ocorreu as 07:00 horas. A água utilizada foi proveniente de açude situado na propriedade da Miriri Alimentos e Bioenergia S/A.

Foram preparadas duas soluções inoculantes de 600 L, em dois reservatórios de 1.000 L, mantidos à sombra. A adição dos sacos do inoculante turfoso na solução foi acompanhada de agitação da solução até obter aspecto molhado da turfa sobrenadante (Figura 10a,b). A cada imersão foram introduzidos 24 sacos de rafia (cada um com aproximadamente 30 rebolos. De uma imersão para a outra a solução foi reaproveitada, adicionando 10 sacos de turfa, e processo de inoculação foi repetido. Após 30 minutos de imersão, os sacos de rafia com rebolos inoculados foram retirados da solução e postos à sombra. Para a distribuição, os sacos de rafia foram depositados no início dos sulcos para então serem distribuídos (Figura 10c).

Figura 10 - Procedimento de inoculação da cana-de-açúcar em campo por imersão de rebolos



Fonte: Compilação de acervo do autor.

APÊNDICE E – Coleta e processamento de amostras de raiz

O procedimento de coleta do solo consistiu na amostragem de solo na linha de plantio e na entrelinha, em torno de uma touceira de cana escolhida aleatoriamente (Figura 11 – a). Pontos de remoção de plantas na coleta aos 140 DAP, e com plantas daninhas foram evitados. O processamento das amostras de raiz consistiu na lavagem de solo sobre peneiras de 2 mm e 1 mm, e separação das raízes retidas nas peneiras sobre superfície branca (Figura 11 – b, c e d).

Figura 11 – Ilustração do procedimento de amostragem de raiz e separação do material radicular



Fonte: Compilação de acervo do autor.