



Fixação Biológica de Nitrogênio em cana-de-açúcar adubada com Molibdênio ⁽¹⁾.

Larissa Grasiela de Arruda Ferreira Costa ⁽²⁾; Renato Lemos dos Santos ⁽³⁾; Fernando José Freire ⁽⁴⁾; Emídio Cantídio Almeida de Oliveira ⁽⁴⁾; Ruthanna Isabelle de Oliveira ⁽⁵⁾; Danúbia Ramos Moreira de Lima ⁽⁵⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos do CNPq, da FACEPE e Capes;

⁽²⁾ Estudante de Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco (IFPE) Campus Vitória de Santo Antão, Vitória de Santo Antão –PE, larissagrasielacosta@gmail.com; ⁽³⁾ Professor do IFPE Campus Vitória de Santo Antão; ^{(4),(4)} Professor da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); ^{(5),(5)} Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo/UFRPE.

RESUMO: Os canaviais brasileiros são adubados com cerca da metade da dose de N que outros países que também se destacam pela produção da cultura. Esse fato pode ser um indício de que as variedades de cana-de-açúcar brasileiras realizam fixação biológica de nitrogênio (FBN), a partir da atividade da nitrogenase (AN), enzima bacteriana. O molibdênio (Mo) atua como um regulador da AN. Portanto, neste trabalho, o objetivo foi avaliar o efeito a adubação com Mo na FBN em cana-de-açúcar. Para isso, foram cultivadas duas variedades de cana-de-açúcar (RB867515 e RB92579), submetidas a duas doses de N (0 e 60 kg ha⁻¹) e duas doses de Mo (0 e 200 g ha⁻¹). Aos 100, 130, 200 e 365 DAP determinaram-se os valores de $\delta^{15}\text{N}$ na folha +1 e estimou-se a FBN pelo método da abundância natural de ¹⁵N. As variedades de cana-de-açúcar RB867515 e RB92579 fixaram N, que foi potencializada pela adubação molíbdica, principalmente, na ausência da adubação nitrogenada.

Termos de indexação: *Saccharum spp.*, abundância natural de ¹⁵N, adubação molíbdica.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar, entretanto um detalhe relacionado à nutrição da cultura desperta atenção (Jadoski et al., 2010). Para Baptista et al. (2014) quando se compara quantidade de adubos nitrogenados utilizados no Brasil com os demais países produtores, como EUA e Índia, correspondem a 40% das doses aplicadas nestes países (Baptista et al., 2014).

Sabe-se que o N na forma inorgânica corresponde a 2% do N total, sendo pouco quanto ao que é requerido pela cultura, e que os fertilizantes tem baixa contribuição na nutrição da cultura no ciclo de cana planta (Bouwman et al., 2005; Franco et al., 2011; Baptista et al., 2014). Assim, afirma-se que a maior quantidade do nutriente absorvido pela planta é oriunda da atmosfera e/ou da mineralização da matéria

orgânica presente no solo. O que tem levantado à hipótese de que a cultura realize associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN), que reduzem o N₂ a NH₃ pela atividade da nitrogenase (AN).

Com base no conhecimento de que o N mineral presente no solo é enriquecido de ¹⁵N em relação à atmosfera e que uma planta fixadora de N₂ tem menores concentrações de ¹⁵N, pode-se estimar a fixação de N₂. Pois, uma planta não fixadora terá a concentração de ¹⁵N semelhante à apresentada no solo (Shearer & Kohl, 1986).

O Mo é um regulador enzimático da AN, enzima responsável pela redução de N₂ a NH₃, estando assim sua utilização diretamente ligada a AN e FBN, para organismos que realizam este processo (Li-Ping et al., 2007; Hernandez, et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os valores de $\delta^{15}\text{N}$ e estimar a FBN pelo método da abundância natural de ¹⁵N, sob o efeito da adubação molíbdica no ciclo de cana planta.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina, no município de Carpina – PE, em um ARGISSOLO VERMELHO AMARELO distrocoeso, de março de 2013 a março 2014.

Foram utilizadas duas variedades de cana-de-açúcar (RB92579 e RB867515), submetidas a duas doses de N (0 e 60 kg ha⁻¹) e duas doses de Mo (0 e 200 g ha⁻¹), baseadas no estudo da interação da adubação nitrogenada e molíbdica em cana-de-açúcar desenvolvida por Oliveira (2012), compondo um arranjo fatorial de (2 x 2 x 2), com quatro repetições, totalizando 32 unidades experimentais. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados. Cada parcela foi composta por sete sulcos de 10 m de comprimento, espaçados por um metro, totalizando 70 m². A área útil foi formada pelos cinco sulcos centrais, descartando-se um metro das extremidades, totalizando 40 m². Os dois sulcos localizados nas extremidades da área útil



foram utilizados para realização das amostragens destrutivas e os outros três sulcos para as amostragens não destrutivas.

Nas laterais dos blocos do ensaio foram distribuídas oito parcelas de área 50% inferior que as parcelas da cana, visando o crescimento de ervas espontâneo, a fim de utilizá-las como referência na estimativa da FBN pelo método da abundância natural de ^{15}N (Shearer & Kohl, 1986).

Aos 100, 130, 200 e 365 dias após o plantio (DAP) foram coletadas aleatoriamente três folhas +1 por parcela para determinação da razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ para estimação de $\delta^{15}\text{N}$. Os tecidos foliares coletados foram secos em estufas de circulação forçada de ar a 65 °C, trituradas em moinhos de facas e tamisadas em peneiras de 100 mesh para determinação espectrômetro de massa, do teor de ^{15}N e estimação do $\delta^{15}\text{N}$. Concomitantemente foram coletadas a parte aérea das plantas espontâneas de referência para determinação do $\delta^{15}\text{N}$. Com os valores de $\delta^{15}\text{N}$ das folhas de cana e das plantas de referência foi estimada a percentagem de N proveniente da FBN pelo método da abundância natural de ^{15}N , segundo a equação proposta por Shearer & Kohl (1986):

$$\%N_{dfa} = 100 \cdot \frac{(\delta^{15}N_{ref} - \delta^{15}N_{fix})}{\delta^{15}N_{ref}}$$

Para a equação tem-se:

$\%N_{dfa}$ = estimativa da porcentagem de N proveniente da FBN na cana-de-açúcar;

$\delta^{15}N_{ref}$ = estimativa da abundância natural de ^{15}N na planta de referência;

$\delta^{15}N_{fix}$ = estimativa da abundância natural de ^{15}N na cana-de-açúcar;

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ e a estimativa da percentagem de N proveniente da FBN foram avaliados considerando-se as variedades de cana, as doses de Mo e de N em diferentes estádios de crescimento da cultura, como medidas repetidas no tempo. Para isso foi utilizado o pacote estatístico SAS Learning 2.0, seguindo o procedimento para modelo misto, sendo selecionado o teste de covariância que apresentou o menor valor do critério de Akaike (Wolfinger & Chang, 1995). Nas variáveis em que se observou efeito significativo ($p < 0,05$) foi realizada análise de regressão em função do tempo. Quando não foi possível a análise de regressão, se aplicou o teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de $\delta^{15}\text{N}$ na folha +1 das variedades RB867515 e RB92579 no ciclo de cana planta se ajustaram ao modelo quadrático (Figura 1). De

forma geral o $\delta^{15}\text{N}$ diminuiu ao longo do ciclo da cultura, o que pode ter ocorrido devido a uma baixa razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ na absorção do N como na atmosfera, indicando que ambas as variedades apresentaram associação com bactérias fixadoras de N. Em média, o valor de $\delta^{15}\text{N}$ foi de 2,71‰ e 2,57‰ para RB867515 e RB92579 respectivamente, o que permite afirmar que a RB92579 fixou mais N_2 atmosférico do que a RB867515.

Observou-se também que para ambas as variedades a aplicação de Mo reduziu os valores de $\delta^{15}\text{N}$ na ausência da adubação nitrogenada (Figura 1). Presumivelmente é correto afirmar que a adubação molíbdica aumentou a FBN, pela incorporação de N ao tecido vegetal com baixa abundância de ^{15}N , o que reduziu o teor de $\delta^{15}\text{N}$, quando houve pouca disponibilidade do mineral no solo. As reduções nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ pela adubação de Mo foram evidentes até 200 DAP, principalmente na variedade RB867515 e permaneceram semelhantes ao final do ciclo da cultura (Figura 1). Possivelmente os processos de distribuição de N na cana e as perdas para o sistema solo-atmosfera é diferente para os isótopos de N, o que pode ser o motivo pelo qual não se mostra precisamente a existência de FBN em cana-de-açúcar, pois o $\delta^{15}\text{N}$ é medido apenas no final de ciclo da cana planta.

Quando se avaliou a potencialização da FBN pela adubação molíbdica, tomando a própria variedade na ausência de Mo como referência, se observa que os valores decresceram ao longo do ciclo da cana planta (Figura 1). As maiores contribuições do N vindo da atmosfera pela adubação de Mo para as plantas aconteceram quando não se aplicou N, terminando o ciclo com a FBN potencializada, para RB867515 e RB92579, em 7 e 11% respectivamente. Mesmo que as estimativas não indiquem o percentual de N absorvido pela cana oriundo da atmosfera, comprovou-se que houve FBN nestas variedades. Mesmo com o menor $\delta^{15}\text{N}$ ocorrido no ciclo da cultura, foi possível identificar a ocorrência da FBN nas variedades de cana não adubadas com N. Na variedade RB867515, os mínimos valores de $\delta^{15}\text{N}$ na ausência da adubação nitrogenada diferiram em 0,15‰, sendo menor na presença da adubação molíbdica, ambos ocorreram no intervalo de 295 a 300 DAP. De acordo com o método da abundância natural de ^{15}N , essa pequena diferença em $\delta^{15}\text{N}$, sugere que o Mo potencializou a FBN em cerca de 6%. Entretanto, na presença da adubação nitrogenada o Mo não potencializou a FBN, pois o $\delta^{15}\text{N}$ foi menor na ausência da adubação molíbdica. Quanto a RB92579, quando não foi adubada com N, o $\delta^{15}\text{N}$ mínimo ocorreu em média aos 267 DAP, com a



antecipação de seis dias pela aplicação de Mo, que reduziu 23%, o que significa dizer que o Mo potencializou a FBN em 23%. Com a aplicação de N, o menor valor de $\delta^{15}\text{N}$ só ocorreu 13 dias mais tarde, sendo maior com a adubação molibídica, assim, a FBN não foi estimulada pelo Mo.

A planta referência usada para estimativa da FBN pelo método da abundância natural do ^{15}N , foi a erva espontânea *Dactyloctenium aegyptium*. Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nesta planta reduziram ao longo do ciclo da cana-de-açúcar (Tabela 1) e foram menores que os estimados nas variedades estudadas, o que inviabilizou a estimativa da FBN por este método.

Problemas relacionados à planta referência na estimativa da FBN foram apontados por Hogberg (1997). Segundo o autor existem diferenças entre a planta na qual se deseja conhecer o potencial de FBN e a planta utilizada como referência, que podem tornar a estimativa incoerente, pois, normalmente, possuem ciclos distintos, apresentam sistemas radiculares diferentes, explorando profundidades diferentes do solo e podem apresentar diferença temporal na absorção de N.

Entretanto, aos 100 DAP, os níveis de $\delta^{15}\text{N}$ na planta referência foram mais altos. Para as estimativas de FBN, cerca de 37% do N absorvido pelo genótipo da cana tiveram a atmosfera como amostra de origem. A contribuição da FBN no N absorvido pela cana aos 100 DAP variou pelo efeito simultâneo das variedades, nas doses de N e da adubação molibídica (Tabela 2). Quanto ao efeito da aplicação de N na contribuição da FBN nas variedades, se observou que a FBN na RB92579 foi reduzida em 26% pela adubação nitrogenada e não variou na RB867515.

A adubação molibídica elevou em 22% a contribuição da FBN nos genótipos de cana-de-açúcar, independentemente da variedade e da aplicação de N.

CONCLUSÕES

As variedades RB867515 e RB92579 fixam N, que foi potencializado pela adubação molibídica, principalmente na ausência da adubação nitrogenada.

AGRADECIMENTOS

Ao grupo de pesquisa em FERTILIDADE DO SOLO E AGROENERGIA do IFPE – *Campus* Vitória de Santo Antão; a Estação Experimental de Cana-de-açúcar de Carpina; a Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE); ao CNPq; a Capes e a Facepe, pelo apoio e fomento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

- BAPTISTA, R. B. et al. Variations in the ^{15}N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N_2 fixation to sugarcane. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 124–129, jan. 2014.
- BOUWMAN, A. F.; DRECHT, G. VAN; HOEK, K. W. VAN DER. Surface N balances and reactive N loss to the environment from global intensive agricultural production systems for the period 1970 — 2030. **Science in China Series C Life Sciences**, v. 48, p. 1–13, 2005.
- EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa, 1997. p. 212
- FRANCO, H. C. J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, v. 121, n. 1, p. 29–41, fev. 2011.
- HARDY, R. W. et al. The acetylene-ethylene assay for $\text{n}(2)$ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant physiology**, v. 43, n. 8, p. 1185–207, ago. 1968.
- HERNANDEZ, J. A et al. Metal trafficking for nitrogen fixation: NifQ donates molybdenum to NifEN/NifH for the biosynthesis of the nitrogenase FeMo-cofactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11679–84, 19 ago. 2008.
- HOGBERG, P. ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. **New Phytologist**, v. 137, p. 179–203, 1997.
- JADOSKI, C. J. et al. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 3, n. 2, p. 169–176, 2010.
- LI-PING, W.; YANG-RUI, L.; LI-TAO, Y. Effects of molybdenum on nitrogenase activity of nitrogen-fixing bacteria in sugarcane.pdf. **Plant Nutrition and Fertilizer Science**, v. 13, n. 1, p. 110–122, 2007. OLIVEIRA, A. C. DE. **Interação da adubação nitrogenada e molibídica em cana-de-açúcar**. [s.l.] Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife, 2012.
- SHEARER, G.; KOHL, D. H. N_2 -Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural ^{15}N Abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, p. 699–756, 1986.
- TEDESCO, M.J., et al. **Análises de solos, plantas e outros materiais**. 2ªed. Porto Alegre, UFRGS. 1995. 174p. (Boletim Técnico, 5).
- WOLFINGER, R.; CHANG, M. **Comparing the SAS @ GLM and MIXED Procedures for Repeated Measures**. Disponível em: <<http://support.sas.com/rnd/app/stat/papers/mixedglm.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2014.

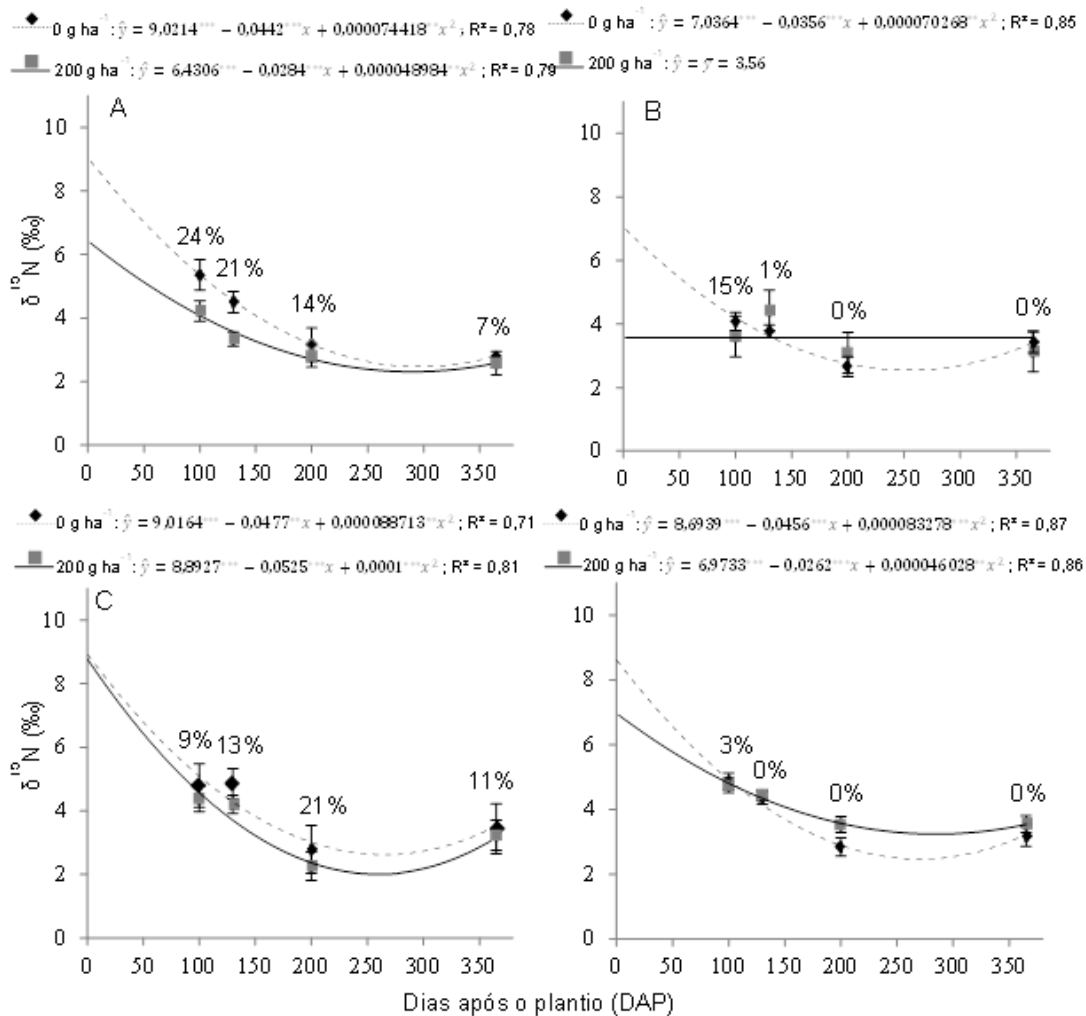


Figura 1 - Valores de $\delta^{15}\text{N}$ na folha +1 de cana-de-açúcar na ausência e presença de molibdênio da variedade RB 867515 na ausência de nitrogênio (A) e na presença de nitrogênio (B) e da variedade RB92579 na ausência de nitrogênio (C) e na presença de nitrogênio (D) aos 70, 100, 130, 200 e 365 dias após o plantio (DAP).

Tabela 1 - Estimativa da porcentagem do N derivado da atmosfera em diferentes variedades de cana-de-açúcar, submetidas a adubação nitrogenada e molíbdica aos 100 dias após o plantio (DAP), análise da variância e coeficiente de variação dos dados

Fator	N (kg ha ⁻¹)		Média
	0	60	
Variedade	----- % -----		
RB867515	37,12 Ba	43,22 Aa	40,17
RB92579	39,61 Aa	29,28 Bb	34,45
Média	38,37	36,25	
Mo (g ha ⁻¹)			
0		33,66 B	
200		40,96 A	
Média		37,31	
CV (%)		15,0	

^aLetras minúsculas iguais na linha e maiúsculas na coluna não diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).