

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

NÍCOLAS BRAGA CASARIN

**Contribuição de diferentes fontes de nitrogênio para a FBN e o
metabolismo de N da soja**

**Piracicaba
2019**

NÍCOLAS BRAGA CASARIN

**Contribuição de diferentes fontes de nitrogênio para a FBN e o
metabolismo de N da soja**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Energia Nuclear na
Agricultura e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior

**Piracicaba
2019**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Casarin, Nicolas Braga

Contribuição de diferentes fontes de nitrogênio para a FBN e o metabolismo de N da soja / Nicolas Braga Casarin; José Lavres Junior. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.

59 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

1. Assimilação de carbono 2. Fertilizantes nitrogenados 3. Fixação de nitrogênio 4. Isótopos estáveis 5. Nitrato redutase 6. Nitrogenase 7. Translocação vegetal
I. Título

CDU 631.461.5 : 633.34

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Aos meus pais Valter Casarin e Meire Cristina
Braga Casarin, ao meu irmão Lucas Braga Casarin,
aos familiares e aos amigos, pelo apoio,
oportunidade de estudo, dedicação e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora pela vida e por iluminar toda minha caminhada.

Ao Professor e orientador Dr. José Lavres Junior por todo o apoio, dedicação, profissionalismo, amizade e confiança desde a época de iniciação científica até o Mestrado.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, por fornecer a infraestrutura necessária para a realização do experimento e o apoio ao longo do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil – CAPES - Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2017/17756-1) pela bolsa de estudos concedida.

À Técnica Cleusa Pereira Cabral, pela amizade, conselhos e auxílio nas análises laboratoriais.

Ao Professor Dr. Gil Miguel de Sousa Câmara, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários do CENA e em especial à secretária Suzineide de Fátima Manesco de Almeida, pela colaboração.

Aos Técnicos Benedita Inês Franco Possignolo Rodrigues, Hugo Batagello, Joaquim Everaldo Martins dos Santos, Marcos José Trevisan e Mariana Belloti pelo auxílio nas análises.

Ao Professor Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, pela ajuda nas análises isotópicas.

À Professora Dra. Renata Alcarde Sermarini, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA: André Luiz Oliveira de Francisco, Antônio Leite Floretino, Elcio Ferreira dos Santos, Felipe Furlan, Fernanda Viginotti Alves de Moraes, Fernando Giovannetti de Macedo, Flávio Henrique Rabêlo, Jéssica Bezerra de Oliveira, Laura Panzarin Nerastri, Luiz Tadeu Jordão, Maria Clara Faria Chaves, Matheus da Cunha Almeida, Natalia Fernandes Carr, Nikolas de Souza Mateus.

Aos amigos do Saponga FC pelo companheirismo e apoio durante esse período.

E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho.

*"Grandes coisas não se fazem por impulso, mas
pela junção de uma série de pequenas coisas."*

Vincent van Gogh

RESUMO

CASARIN, N.B. **Contribuição de diferentes fontes de nitrogênio para a FBN e o metabolismo de N da soja.** 2019. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na principal fonte de obtenção de nitrogênio (N) pela cultura da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. A aplicação de fertilizantes nitrogenados pode comprometer a eficiência da nodulação e não ser traduzida em ganhos significativos de produtividade, representando assim um custo dispensável ao produtor. Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito exclusivo da FBN, da aplicação de nitrogênio mineral (ureia) no estágio fenológico V1, no florescimento e em ambos os momentos para avaliar a quantidade de ^{15}N na planta proveniente do solo, do fertilizante e da fixação biológica de nitrogênio (FBN) - por meio da técnica de diluição isotópica -, avaliar a nodulação, a atividade da nitrogenase e nitrato redutase, a concentração e o acúmulo de N, a redistribuição de N, o crescimento e a produção de grãos das plantas. As plantas de soja não responderam à aplicação de N na maioria das variáveis. A massa de matéria seca das raízes, parte aérea e grãos, os componentes de produtividade, a atividade da nitrato redutase, a taxa de assimilação de CO_2 , a concentração e o acúmulo de N nas partes da planta, no fim do ciclo, não diferiram entre as formas de aplicação de N. Quando foi aplicada ureia em V1, houve redução no número de nódulos avaliados em V4 e redução na atividade da nitrogenase no florescimento. As folhas e a haste foram responsáveis pela maior parte da remobilização de N aos grãos. Mais de 50% do N-total das partes da planta, em todos os tratamentos, vieram da FBN, exceto para as folhas nos tratamentos com aplicação de N via solo. Nos grãos, a FBN contribuiu com aproximadamente 80% do N-total acumulado quando houve aplicação de ureia em V1, 96% no tratamento com ureia via foliar no florescimento e 75% com ambas as aplicações.

Palavras-chave: Nitrogenase. Nitrato redutase. Fixação biológica de N. Taxa fotossintética. Técnica isotópica.

ABSTRACT

CASARIN, N.B. **The contribution of different nitrogen sources to BNF and soybean N-metabolism.** 2019. 59 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Biological nitrogen fixation (BNF) is the main source of nitrogen (N) uptake and assimilation by soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] crop. The hypothesis to be verified is whether the mineral-N supply as fertilizer can decrease nodulation and N-metabolism as well as reduce grains yield and shoot biomass. The aims of this work were to evaluate the main effect of BNF, the application of mineral nitrogen (urea) at V1 phenological stage, flowering and both times and quantify the soil-N supply in order to evaluate the amount of ^{15}N taken up by plants from soil, fertilizer and the contribution of BNF, by means of the isotope dilution technique. We have evaluated plant nodulation, nitrogenase and nitrate reductase activity, quantification of N concentration and accumulation, N redistribution (retranslocation), growth, biomass and grains yield. Soybean plants did not respond to N application for the most of variables. The root, shoot and grain dry weight, yield components, nitrate reductase activity, CO_2 assimilation rate, N-concentration and N-accumulation at R8 phenological stage did not differ, regardless N application. When applied at V1, urea reduced the number of nodules accounted at V4 phenological stage and the nitrogenase activity at flowering. Leaves and stem were the main source for most of N redistributed to grains (sink). BNF provided more than 50% of the total plant N in all treatments, except for leaves of plants that received N application to soil. Nearly 80% of grains N derived from BNF when urea was applied at V1, 96% for the foliar N treatment at flowering and 75% for both N applications.

Keywords: Nitrogenase. Nitrate reductase. Biological nitrogen fixation. Photosynthesis. Isotope technique.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	A cultura da soja	18
2.2	Nitrogênio	20
2.3	Fixação biológica de nitrogênio (FBN)	22
2.4	Efeito do N mineral na FBN	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Local, período e espécie vegetal	26
3.2	Instalação, desenvolvimento do experimento e delineamento estatístico	26
3.3	Participação do N proveniente da fixação biológica, do fertilizante e do solo	28
3.4	Remobilização de N	28
3.5	N total	29
3.6	Massa e número de nódulos	29
3.7	Taxa de assimilação de CO ₂	29
3.8	Atividade da nitrato redutase nas folhas	29
3.9	Atividade da nitrogenase nos nódulos	30
3.10	Massa de matéria seca de grãos, parte aérea e raízes	30
3.11	Componentes de produtividade da soja	30
3.12	Análise estatística dos resultados	30

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Massa de matéria seca	31
4.2	Número e massa de matéria seca de nódulos	33
4.3	Componentes de produtividade	35
4.4	Atividade da nitrato redutase	36
4.5	Atividade da nitrogenase	37
4.6	Taxa de assimilação de CO ₂	38
4.7	Concentração e acúmulo de N	40
4.8	Remobilização de N	43
4.9	Contribuição das fontes de N	45
5	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) possui destaque no agronegócio brasileiro e é uma das principais plantas oleaginosas cultivadas no país. Os produtos do complexo soja respondem por cerca de 40% das exportações brasileiras (BRASIL, 2018). A cultura também apresenta grande relevância global, com produção mundial de cerca de 340 milhões de Mg na safra 2017/2018 (USDA, 2018). Os maiores produtores são Estados Unidos, Brasil e Argentina, sendo os dois primeiros os principais exportadores. No Brasil, considerando também a safra 2015/2016, a produção foi de 119,3 milhões de toneladas em uma área de 35,1 milhões de hectares, sendo os Estados de MT, PR e RS são os principais produtores (CONAB, 2018).

O macronutriente nitrogênio (N) representa grande importância econômica na cultura da soja, pois os grãos apresentam uma elevada concentração relativa de proteínas, cerca de 40%, o que confere à soja a classificação de planta proteoleguminosa. Por desempenhar papel fundamental na síntese das proteínas, a planta demanda altas quantidades de N, chegando a acumular de 250 a 280 kg de N ha⁻¹ em casos onde a produtividade excede 4 Mg ha⁻¹, sendo que 67 a 75% deste está alocado nos grãos (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; BOHRER; HUNGRIA, 1998).

A associação simbiótica com rizóbios do solo possibilita à soja obter N a partir do N atmosférico (N₂) através do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN). As bactérias possuem vida livre no solo e, ao infectar raízes de plantas (geralmente da família *Leguminosae*), formam nódulos, onde os organismos são capazes de converter o N₂ atmosférico em amônio, o qual é fornecido diretamente à planta em troca nutrientes e carboidratos (TAIZ; ZEIGER, 2004) e, segundo King e Purcell (2005) a principal forma de transporte do N dos nódulos até a planta são os ureídeos. O complexo enzima nitrogenase é responsável pela fixação do N e funciona em condição de anaerobiose (BURRIS, 1999; MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995). Segundo Smith e Hume (1987) a contribuição da FBN para a planta pode chegar a 103 kg de N ha⁻¹ e Alves, Boddey e Urquiaga (2003) destacam a alta eficiência da simbiose e afirmam que dificilmente a fertilização nitrogenada resulta em acréscimos na produtividade quando feita a inoculação corretamente. Em condições de alta disponibilidade de N no solo, a planta prioriza a absorção deste e a atividade dos rizóbios diminui, uma vez que o nutriente está numa forma prontamente disponível para a soja, com menor gasto energético em relação à FBN (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). A recomendação é que, se houver aplicação de

fertilizante contendo N na semeadura, a mesma não exceda 20 kg de N ha⁻¹ (EMBRAPA, 2013). Hungria, Campo e Mendes (2001) relataram que em diversos trabalhos a aplicação de doses de N variando de 20 a 40 kg ha⁻¹ não elevou a produtividade e, ainda, afetou negativamente a nodulação, tanto em sistema de plantio convencional, quanto em plantio direto. Piorezan et al. (2015) constataram que a aplicação foliar da dose de ureia (¹⁵N) até 1.950 g ha⁻¹ de N em plantas de soja no estágio fenológico R1, ou R3, promoveu incrementos no acúmulo de N nos grãos e nas folhas, principalmente nos anos com menor quantidade de chuva, mas não aumentou a produtividade de grãos. Por outro lado, Ray, Heatherly e Fritschi (2006) observaram acréscimo na produtividade de soja com a aplicação de N mineral, para os casos de cultivo irrigado e não-irrigado.

A prática do uso constante de inoculantes é essencial para manter um bom número de rizóbios no solo, assim como a eficácia na nodulação. Comercialmente, estirpes das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* são as mais comuns e mais vendidas (CHUEIRE et al., 2003). Mendes, Hungria e Vargas (2003), em solos de cerrado brasileiro, não observaram aumento de produtividade com a aplicação de diferentes doses de N no início do cultivo da soja inoculada com bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, além da redução de até 50% na nodulação nos primeiros 15 dias do ciclo em condições de aplicação de pequenas doses de N (até 40 kg ha⁻¹). Como o custo do fertilizante nitrogenado é elevado, por conta dos processos altamente dispendiosos (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2001), e os inoculantes possuem um preço menor, dispensar a adubação com N na soja e investir na inoculação é economicamente viável uma vez que a produtividade não é afetada e o custo de produção é reduzido. Segundo Hungria et al. (2005), estima-se que há a economia de três bilhões de dólares anualmente com fertilizantes nitrogenados no Brasil por meio da exploração da FBN.

Durante o período reprodutivo, a FBN apresenta dois picos, inicialmente em R2 (florescimento pleno) e novamente em R5 (um pouco após o início da granação), posteriormente tendo sua eficiência reduzida durante o enchimento de grãos, fase em que há maior demanda de N pela planta (FEHR; CAVINESS, 1977; SHIBLES, 1998; WATANABE; TABUCHI; NAKANO, 1986). Por conta disso, acreditou-se ser necessária uma suplementação tardia com N para atender a exigência da cultura e evitar perdas de produtividade (CÂMARA, 2014).

Alguns trabalhos apresentaram resultados positivos da suplementação tardia com N. Gan et al. (2003) avaliaram a aplicação de ureia via solo em R1 (início do florescimento), R3 (início da frutificação) e R5 (início da granação), sendo que apenas no primeiro estágio fenológico (R1) foi observado aumento na produtividade. Mendes et al. (2008) utilizaram

diferentes fertilizantes nitrogenados via solo, em R1 e R5, e obtiveram acréscimos de produtividade em todos os casos, porém sem retorno econômico. Afza et al. (1997), por meio de adubação com N parcelada na fase reprodutiva, alcançaram ganhos de produtividade de até 34%. Outros autores aplicaram N suplementar em diferentes estádios fenológicos da cultura da soja e não obtiveram resposta na produção de grãos. Barker e Sawyer (2005) aplicaram ureia e ureia revestida via solo em R2 e R3, com duas doses, e a produtividade foi similar à do controle (sem N), todos inoculados. Shibles (1998) aplicou ureia foliar em R5 e obteve resultados inconsistentes, não confirmando a eficácia da adubação nitrogenada suplementar.

O estudo da remobilização de N dos diversos órgãos da planta para os grãos em formação e da contribuição da FBN para a concentração final de N nos grãos possibilitou o desenvolvimento de hipóteses de como a soja conseguia obter altas produtividades mesmo com o decréscimo da FBN em um período de alta demanda do nutriente. Lavres, Franco e Câmara (2016) observaram que, em condições de adequado suprimento de níquel (Ni), 99% do N acumulados nos grãos foram provenientes da fixação biológica de N₂. Mastrodomenico e Purcell (2012) também confirmaram a grande contribuição da FBN para o enchimento de grãos, constatando que 90% do N nos grãos, em condições hídricas adequadas, foram oriundos da FBN. Portanto, esses resultados sustentam a ideia de que a planta remobiliza N dos seus órgãos para os grãos, compensando a redução na eficiência da fixação, notadamente após o segundo pico da FBN, em R5 (FEHR; CAVINESS, 1977).

Como contextualizado acima, são notórias as grandes variações de respostas para as mais distintas formas de aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura da soja. Os produtores têm buscado garantir sua produção por meio de aplicações do nutriente, tanto na semeadura, quanto em estádios reprodutivos (principalmente no florescimento), podendo muitas vezes representar um custo dispensável. O presente trabalho visa contribuir para os estudos de adubação nitrogenada da soja, bem como no entendimento da fisiologia da FBN em soja.

A hipótese do presente trabalho é que a aplicação de N mineral, em dose que teoricamente não afeta a nodulação, não altera as atividades fisiológicas das plantas de soja e não incrementa a produção de grãos.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar o efeito da aplicação de N na cultura da soja, seja via solo, foliar ou combinação das duas, na fixação biológica de N e na produção de grãos. Outras variáveis, como atividade enzimática, assimilação de CO₂ e remobilização de N foram avaliadas, com a finalidade de correlacioná-los aos efeitos na FBN e na produção e qualidade dos grãos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

A soja [*Glycine max* (L.) Merrill] é uma planta de ciclo anual pertencente à família Fabaceae. Seu local de origem ainda é incerto, não há um consenso entre os autores acerca disso, porém todos dizem que o centro é o leste da Ásia. Morse (1950) afirmou ainda que o local de origem seria a área central da China, com o registro mais antigo datado em 2838 A.C. Sua introdução no Brasil ocorreu, de acordo com os registros, em 1882, quando testes foram realizados no estado da Bahia. Posteriormente, novos testes foram realizados em outros estados do país, permitindo o estabelecimento da cultura em diversas condições climáticas, até que em 1949 o Brasil se tornou produtor de soja (BONATO; BONATO, 1987).

No Brasil, a cultura da soja é responsável pela maior parcela de área plantada e esse número cresce a cada ano. Desde a safra de 2006/07 até a safra de 2017/18 houve um aumento de 70% na área plantada com soja no país, atingindo a marca de 35,15 milhões de hectares. A produção também segue essa tendência, com estimativa de quase 119 milhões de toneladas de grãos para a safra 2017/18, figurando como o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos da América. Os estados do Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Goiás são os maiores produtores nacionais, em ordem decrescente, e responsáveis por 68% de toda a produção brasileira de grãos de soja. A produtividade na safra 2017/18 alcançou o recorde de 3.385 kg ha⁻¹, superando os 3.364 kg ha⁻¹ da safra 2016/17, indicando o uso de um bom pacote tecnológico, aliado a boas condições climáticas. As exportações para o ano de 2018 devem atingir 74 milhões de toneladas, devido, em especial, às taxas de 25% aplicadas pela China sobre a soja proveniente dos Estados Unidos, que elevou a demanda do país asiático pela soja brasileira (CONAB, 2018).

Os grãos de soja desempenham importante papel na alimentação humana e, principalmente, animal, pois possuem alto teor protéico (cerca de 40%) e lipídico (cerca de 20%), além de disponibilizar quase todos os aminoácidos essenciais em quantidade suficiente (COSTA; MIYA, 1972; LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2010). De toda a produção mundial de soja, 95% é destinada para a produção de óleo e farelo. Cerca de 31% do óleo vegetal consumido no mundo é de soja, majoritariamente para alimentação humana, e 70% do farelo consumido mundialmente também provém da soja, neste caso com a finalidade de conversão de proteína vegetal a animal, com maior participação dos setores de produção avícola e suína. O aumento no consumo de carne (proteína animal) por grandes países como China, Brasil e

Estados Unidos nos últimos anos, aliado à alta qualidade nutricional e alto teor protéico (44% a 49%) do farelo de soja, provocou um acréscimo considerável na demanda e, conseqüentemente, na produção de grãos de soja (PEREIRA, 2004).

Encontra-se no mercado uma grande variedade de cultivares de soja, com diferentes características entre eles. A precocidade é uma delas e é possível encontrar desde cultivares muito precoces até tardios, de acordo com as regiões de cultivo. Isso ocorre devido à sensibilidade da soja ao fotoperiodismo, uma vez que a planta necessita de estímulos provocados pela duração do dia para iniciar sua fase reprodutiva. Cada cultivar possui um certo fotoperíodo crítico, o qual serve como referência. Enquanto a duração de exposição à luz for superior, em horas, à duração do fotoperíodo crítico, a planta continua seu crescimento vegetativo até que o período luminoso seja menor que esse limite crítico, quando se dá início ao florescimento, motivo pelo qual a soja é considerada uma planta de “dias curtos”. Isso também baliza a época de semeadura, pois um atraso ou adiantamento na operação pode resultar em uma fase vegetativa muito longa, com plantas muito altas e suscetíveis ao acamamento ou em uma fase vegetativa muito curta, com plantas pequenas, com poucos nós e, conseqüentemente, baixa produtividade de grãos (GARNER; ALLARD, 1920).

Outra diferença entre os cultivares está no tipo de crescimento das plantas, o qual pode ser determinado (TCD) ou indeterminado (TCI). Um cultivar TCD, ao atingir a fase reprodutiva, cessa totalmente seu crescimento vegetativo, enquanto que o cultivar TCI, na mesma condição, apresenta os desenvolvimentos reprodutivo e vegetativo simultaneamente. Essa diferença garante a um cultivar TCI uma maior capacidade de mitigar efeitos deletérios causados por estresses do que um cultivar TCD, devido ao prolongamento da fase vegetativa (FEHR; CAVINESS; VORST, 1977). Por outro lado, segundo estudo realizado por Perini et al. (2012), não há efeito do tipo de crescimento sobre os componentes de produção da planta, como massa de matéria seca da planta e de grãos por planta, índice de colheita, massa de mil grãos e número de vagens e grãos por planta. Os autores encontraram diferença apenas na altura de plantas, sendo aquelas de TCI mais altas. Ainda existem cultivares com tipo de crescimento semi-determinado, cujo crescimento vegetativo se estende após o início do florescimento, porém se encerra previamente aos cultivares de TCI (BERNARD, 1972).

2.2 Nitrogênio

O macronutriente nitrogênio (N) é aquele demandado em maior quantidade pela soja devido ao alto teor de proteína em seus grãos, com exigência de aproximadamente 80 kg de N por tonelada de grãos, chegando a acumular de 250 a 280 kg de N ha⁻¹ em casos onde a produtividade excede 4.000 kg ha⁻¹, sendo que 67 a 75% deste estão alocados nos grãos (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; BOHRER; HUNGRIA, 1998; KINUGASA et al., 2012; SATURNO et al., 2017). A planta de soja pode obter o N de duas fontes: o *pool* de N mineral do solo, que pode ser proveniente da matéria orgânica do solo, ou de fertilizantes nitrogenados, e a fixação biológica do N₂ atmosférico (FBN). Os grãos produzidos irão conter N proveniente dessas duas fontes e também da remobilização de N dos órgãos vegetativos (KINUGASA et al., 2012).

No solo, as principais formas de ocorrência do N são os íons nitrato (NO₃⁻), altamente móvel na solução do solo, e amônio (NH₄⁺), sendo também encontrado na forma de aminoácidos, em menor concentração (JAMTGARD; NASHOLM; HUSS-DANELL, 2008). Previamente à absorção, deve haver o contato íon-raiz, que no caso do N ocorre em maior proporção por fluxo de massa, com participação em menor escala da difusão (MALAVOLTA, 1980; YAMADA, 2002). A preferência da planta pela absorção de NO₃⁻ ou NH₄⁺ depende da espécie ou da condição do solo; aquelas adaptadas a baixos níveis de pH e em solos redutores absorvem mais NH₄⁺, enquanto que em solos com maior pH e condição aeróbica há predomínio da absorção de NO₃⁻. A absorção de N (que é governada pelo fluxo transpiratório) ocorre por meio de transportadores, que são divididos em mecanismos de transportadores de baixa afinidade (*Low-affinity transport system* – LATS) e de alta afinidade (*High-affinity transport system* – HATS). Para o NO₃⁻, os LATS são codificados por genes da família *NRT1* e os HATS por genes da família *NRT2* e atuam quando a concentração de nitrato na solução do solo é alta e baixa, respectivamente. No caso do NH₄⁺, os transportadores LATS e HATS são codificados por genes da família *AMT* e estão presentes em grande número em plantas cultivadas submersas em água, como por exemplo o arroz inundado (MAATHUIS, 2009; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Em três estudos, de Lee et al. (2007), Svennerstam, Ganeted e Nasholm (2008) e Svennerstam et al. (2007), com plantas de *Arabidopsis thaliana*, os autores encontraram indícios da participação de três transportadores (*Lysine Histidine Transporter 1* – LHT1 e *Amino Acid Permease 1 e 5* – AAP1 e AAP5) na absorção de formas orgânicas de N pelas raízes. O nitrato absorvido e presente nas raízes pode ser acumulado em vacúolos, reduzido à amônio, ou translocado para órgãos da parte

aérea para redução ou armazenamento nos vacúolos para osmorregulação (TISCHNER, 2000).

Uma vez absorvido, os componentes nitrogenados são transportados via xilema para os diferentes órgãos da planta. As principais formas em que o N está presente na seiva do xilema são NO_3^- , amidas, aminoácidos e ureídeos (BOLLARD, 1957; PATE, 1973). Em plantas de soja noduladas, há maior ocorrência relativa de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) na seiva, pois possuem menor relação C:N em relação a outros compostos nitrogenados, como as amidas, resultando em maior economia no uso de C (MINCHIN et al., 1981). Os ureídeos são os principais produtos formados a partir da fixação do N_2 atmosférico e essa transformação ocorre a partir da ação da enzima xantina desidrogenase nas células infectadas dos nódulos, resultando na formação de urato, que é posteriormente movido para as células não infectadas, onde é oxidado pela urato oxidase (ou uricase) e catalase nos peroxissomos, formando a alantoína. A formação do ácido alantóico se dá pela hidrólise da alantoína, catalizada pela enzima alantoinase (BULBUL et al., 2008). Diversos autores estudaram o uso do método da abundância relativa de ureídeos na seiva do xilema para quantificar a fixação biológica de N e o efeito da aplicação de nitrato no solo ou em solução nutritiva, chegando à conclusão que a adição do N mineral reduz a atividade de fixação e, conseqüentemente, a concentração relativa de ureídeos na seiva (HERRIDGE, 1982; HERRIDGE; BERGERSEN; PEOPLES, 1990; MCCLURE; ISRAEL, 1979). Dentre os aminoácidos presentes na seiva do xilema das plantas de soja, o mais abundante é a asparagina (MCCLURE; ISRAEL, 1979). Em um estudo de Sawazaki, Sodek e Teixeira (1987), os autores observaram um aumento nos teores de glutamina e asparagina na seiva em tratamentos com aplicação de N amoniacal em solução nutritiva, enquanto que a aplicação de N nítrico elevou os teores de ácido aspártico e N-NO_3^- .

Após a absorção das formas inorgânicas de N, há a necessidade da sua assimilação em formas orgânicas. O NO_3^- absorvido precisa ser reduzido a NH_4^+ e essa reação se inicia no citoplasma de células das raízes ou da parte aérea com a redução de nitrato para nitrito (NO_2^-), catalizada pela enzima nitrato redutase (NR). O NO_2^- é transportado para o cloroplasto (ou plastídeo, nas raízes), onde ocorre a redução do nitrito a amônio pela enzima nitrito redutase (NiR). Posteriormente, o NH_4^+ , que pode ter sido absorvido nessa forma, formado na redução do NO_3^- , na fixação do N_2 atmosférico, na fotorrespiração ou na reciclagem de aminoácidos, é assimilado nos cloroplastos/plastídeos pelo ciclo GS/GOGAT. O amônio é inicialmente transformado em glutamina pela glutamina sintetase (GS), que por sua vez reage com o composto 2-oxoglutarato, reação catalisada pela glutamato sintase (GOGAT), formando duas

moléculas de glutamato. Uma das moléculas de glutamato formada é requerida para manter o funcionamento do ciclo de assimilação do amônio, enquanto a outra é utilizada para biossíntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros compostos nitrogenados, por meio de transaminação (HAWKESFORD et al., 2012; MAATHUIS, 2009; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010; MEYER; STITT, 2001; TISCHNER, 2000).

Em estádios fenológicos mais avançados, principalmente na fase reprodutiva, ocorre a remobilização do N de tecidos mais velhos (proteínas nos órgãos vegetativos) para órgãos reprodutivos e/ou de reserva (LI et al., 2015). Os cloroplastos são as principais fontes de N remobilizado, devido à presença da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO), que representa 50% do total de proteínas solúveis nas folhas de plantas C_3 , e das moléculas de clorofila (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010; PARRY et al., 2003). O processo de degradação dos cloroplastos ainda não é totalmente conhecido, mas há indícios da participação de proteases, vacúolos associados à senescência (SAVs) e mecanismos de autofagia, formando aminoácidos e outros compostos nitrogenados, que são altamente móveis quanto à redistribuição no floema (LI et al., 2015; ROBERTS et al., 2012; WADA et al., 2009). A importância da remobilização se deve à redução nas taxas de absorção de N do solo e de fixação de N_2 atmosférico na fase de enchimento de grãos (SALON et al., 2001). Em um trabalho com trigo, Kichey et al. (2007) observaram que, em média, 71% do N presente nos grãos vieram da remobilização.

A numerosa lista de trabalhos com plantas envolvendo o N se deve à grande diversidade de funções que ele exerce no metabolismo vegetal, sendo constituinte integral de compostos como aminoácidos, amidas, proteínas, nucleotídeos, ácidos nucleicos, clorofila, coenzimas, fitohormônios e até compostos do metabolismo secundário, como os alcalóides (HAWKESFORD et al., 2012; MENGEL; KIRKBY, 2001; TAIZ; ZEIGER, 2004).

2.3 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A FBN é um processo realizado por meio da simbiose entre plantas da família Fabaceae e rizóbios (bactérias fixadoras) e consiste na transformação do N_2 atmosférico em amônia por bactérias dos gêneros *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Photrhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, sendo o *Bradyrhizobium* aquele mais encontrado nos produtos comerciais e em associação com plantas de soja (CHUEIRE et al., 2003; HOWARD; REES, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2004). Peoples e Craswell (1992) e Schlesinger (1997) indicaram que

a contribuição da fixação biológica para o ciclo de N está na faixa de 170 milhões de Mg de N por ano, enquanto que Herridge, Peoples e Boddey (2008) encontraram valores de 50 a 70 milhões de Mg de N fixados biologicamente por ano apenas em sistemas agrícolas, sendo que na cultura da soja, no Brasil, 4,6 milhões de Mg de N vêm da FBN anualmente. Segundo Döbereiner (1997), desde o início do plantio de soja no Brasil, 150 milhões de toneladas de N vieram da FBN, o que representou uma economia de US\$ 3,2 bilhões em fertilizantes nitrogenados. Atualmente, mais de vinte anos após a publicação deste trabalho, com o crescimento da cultura que hoje é a mais plantada no país, a contribuição da FBN e a economia com fertilizantes devem ter aumentado consideravelmente.

O custo energético para a realização da fixação biológica de N é alto, com o consumo de 16 ATPs para produzir duas moléculas de NH_3 a partir de uma molécula de N_2 atmosférico (TAIZ; ZEIGER, 2004). Segundo Heytler, Reddy e Hardy (1985), são necessários 12 g de CH_2O para fixar 1 g de N_2 . A molécula de N_2 , por possuir uma tripla ligação entre os átomos de N, requer alta energia para quebrá-la, o que animais e plantas são incapazes de realizar. O processo industrial de *Haber-Bosch*, capaz de transformar o N_2 atmosférico em NH_3 , demanda temperatura e pressão altíssimas e produz 80 milhões de toneladas de N por ano, menos da metade do que é fixado biologicamente (HOWARD; REES, 1996; SCHLESINGER, 1997). Silsbury (1977) demonstrou, a partir do consumo de C, que plantas de soja que obtêm N exclusivamente da FBN apresentam um custo energético maior (810 mg de CO_2) que aquelas que obtêm N exclusivamente do N mineral (510 mg de CO_2) para produzir 1 g de material vegetal seco. Portanto, sob condição de disponibilidade de N no solo, a planta prioriza a absorção do N mineral e reduz a nodulação visando a economia de energia.

Sob condição de N limitante no solo, as raízes das plantas de soja liberam compostos do metabolismo secundário, como os flavonóides, que codificam a proteína NodD presente nos rizóbios de vida livre, a qual induz a transcrição dos genes de nodulação (*nod*). Os genes *nod* estão envolvidos na síntese dos fatores Nod, moléculas sinalizadoras de nodulação, que ativam as lectinas, receptores da leguminosa para o fator Nod, possibilitando a ligação do rizóbio à parede celular dos pêlos radiculares. A partir dessa sinalização, o rizóbio libera fatores Nod que induzem o enrolamento das células do pêlo radicular e a degradação da parede celular, permitindo que as bactérias adentrem a região externa da membrana plasmática das células e formem um canal de infecção, promovendo assim a formação dos nódulos (FAGAN et al., 1997; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O processo de fixação do N₂ a NH₃ é catalisado pelo complexo enzima nitrogenase, que é formado por uma ferro-proteína (Fe-proteína) e uma molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína), e consiste na seguinte reação (TAIZ; ZEIGER, 2004):



Para que a fixação ocorra, é necessária condição de anaerobiose, pois o oxigênio (O₂) inativa irreversivelmente a nitrogenase (MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995). A leghemoglobina é uma heme proteína com alta afinidade pelo O₂ presente em alta concentração nos nódulos, mantendo a condição de anaerobiose e armazenando oxigênio para a respiração nodular (DENINSON; HARTEK, 1995). Como o NH₃ formado é tóxico às plantas, então após a fixação há a transformação nos nódulos em: (i) NH₄⁺, o qual é assimilado pelos ciclos GS e GOGAT e transportado pelo xilema na forma principalmente de asparagina, ou (ii) ureídeos, dentre os quais se pode citar o ácido alantóico e a alantoina, formas orgânicas que são transportadas para a parte aérea da planta pelo xilema, onde serão catabolizadas a amônio, que será assimilado (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Diversos fatores influenciam na nodulação e na atividade de FBN, dentre eles o pH do meio, a luz, a tensão de O₂, a umidade, a concentração e disponibilidade de N no substrato, a temperatura e a salinidade (FAGAN et al., 2007; KAMICKER; BRILL, 1986; KUZMA et al., 1999; MYLONA; PAWLOWSKI; BISSELING, 1995; SILVA; FREITAS; STAMFORD, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2004; ZHANG et al., 1996). Outro importante fator é a nutrição adequada da soja, pois é conhecido que muitos nutrientes participam do processo de fixação. A nitrogenase apresenta em sua composição Mo, Fe e o enxofre (S); a hidrogenase, enzima que quebra o H₂ para fornecer elétrons à nitrogenase, requer Fe, S e selênio (Se), além do níquel (Ni) para funcionar; os precursores da leghemoglobina são compostos por cobalto (Co); a ferredoxina, doadora de elétrons para a Fe-proteína, é formada por S e Fe; as enzimas nitrato e nitrito redutase atuam sob suprimento adequado de Mo e Mg, respectivamente; e a assimilação de NH₄⁺ pelos ciclos GS e GOGAT requerem Mg (MALAVOLTA, 2006). O manganês (Mn) participa na catálise de processos enzimáticos e transferência de elétrons e o fósforo (P) é fundamental para a nodulação e funcionamento do processo de fixação, devido à demanda por ATP pelo complexo nitrogenase (SÁ; ISRAEL, 1991; VADEZ et al., 2000).

2.4 Efeito do N mineral na FBN

A disponibilidade de N mineral no solo afeta negativamente tanto a nodulação como a FBN nos nódulos, como muitos trabalhos já comprovaram (FRANCO; DA FONSECA; MARRIEL, 1978; KASCHUK et al., 2016; SATURNO et al., 2017). Segundo Deninson e Harter (1995), a presença do N mineral reduz a permeabilidade do córtex dos nódulos, diminuindo a disponibilidade de O₂ para a respiração nodular, e reduz a afinidade da leghemoglobina ao O₂, aumentando a concentração de oxigênio que inativa o complexo nitrogenase, afetando a FBN. A aplicação de doses de N até 20 kg ha⁻¹ não trazem prejuízos à nodulação e à FBN, sendo utilizada por alguns produtores com a justificativa de garantir a nutrição em N até a soja iniciar a nodulação nos estádios fenológicos V1 e V2 (CÂMARA, 2014; EMBRAPA SOJA, 2013).

Mesmo com o efeito adverso do N mineral na FBN, não há um consenso na literatura sobre a necessidade ou não da aplicação de fertilizantes nitrogenados. Alguns autores encontraram resposta positiva da aplicação de N na produção de grãos de soja (GAN et al., 2003; MEHMET, 2008; OSBORNE; RIEDELL, 2006). Como citado anteriormente, há a influência de vários fatores externos na FBN e, em alguns casos, pode se fazer necessária a suplementação de N quando a FBN não consegue suprir a demanda de N (SALVAGIOTTI et al., 2008). Por outro lado, muitos autores encontraram ausência de resposta à fertilização nitrogenada, defendendo a hipótese de que a fixação biológica de N₂ atmosférico é capaz de suprir a demanda da planta em N (BARKER; SAWYER, 2005; KASCHUK et al., 2016; MENDES; HUNGRIA; VARGAS, 2003; SATURNO et al., 2017). É importante ressaltar que os fertilizantes nitrogenados representam alto custo ao produtor e, mesmo que haja ganhos na produtividade, deve-se analisar se sua aplicação é economicamente viável. Em ambientes de alto potencial produtivo, a demanda por N também é maior, portanto são necessários estudos para avaliar a capacidade da FBN em atender essa demanda, avaliando novas tecnologias de inoculação, manejos de solo e da cultura e medidas mais detalhadas da contribuição do N nativo do solo (SALVAGIOTTI et al., 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local, período e espécie vegetal

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação localizada no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), da Universidade de São Paulo (USP), em Piracicaba – SP, a partir do dia 06 de dezembro de 2017 a 22 de março de 2018, com o cultivar de soja BMX Potência RR, o qual possui hábito de crescimento indeterminado e grupo de maturação relativa (GMR) 6.7.

3.2 Instalação, desenvolvimento do experimento e delineamento estatístico

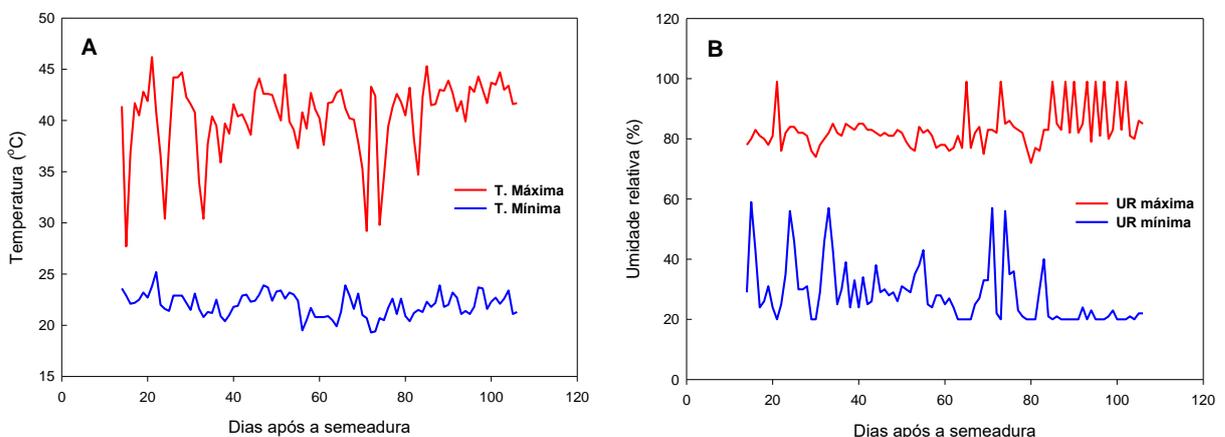
As plantas foram obtidas a partir da semeadura de dez sementes do cultivar, a 2,0 cm de profundidade, em vasos com capacidade de 5 dm⁻³ preenchidos com terra proveniente de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico típico (LVAd) (EMBRAPA, 2006), coletado em Piracicaba-SP. Coletou-se uma amostra da camada superficial (0-0,2 m) do solo em área com histórico de plantio de soja. Após a coleta, as amostras foram secas ao ar e passadas em peneira de 4 mm de abertura de malha, posteriormente sub amostras denominadas de terras finas secas ao ar (TFSA) foram passadas em peneiras de 2 mm de abertura de malha, homogeneizadas, amostradas e caracterizadas. O solo utilizado apresentou as seguintes características químicas (RAIJ et al., 2001): pH (CaCl₂) 5,4; P (resina) 27,8 mg dm⁻³; K (resina) 2,8 mmol_c dm⁻³; Ca (resina) 20 mmol_c dm⁻³; Mg (resina) 8,6 mmol_c dm⁻³; Al 0 mmol_c dm⁻³; H+Al (tampão SMP) 20,8 mmol_c dm⁻³; soma de bases 31,6 mmol_c dm⁻³; CTC 52,4 mmol_c dm⁻³; saturação de bases 60%; saturação por Al 0%; B (água quente) 0,21 mg dm⁻³; Cu (DTPA) 1,6 mg dm⁻³; Fe (DTPA) 28,8 mg dm⁻³; Mn (DTPA) 3,0 mg dm⁻³; Zn (DTPA) 5,1 mg dm⁻³ e C orgânico 10,3 g dm⁻³. A análise granulométrica (GEE; OR, 2002) do solo apresentou os seguintes resultados: areia (>0,05 mm) 360 g kg⁻¹; silte (>0,002 mm e <0,05 mm) 20 g kg⁻¹ e argila (<0,002 mm) 162 g kg⁻¹. Não foi necessário efetuar a correção da acidez e da fertilidade do solo utilizado.

Posteriormente, foi realizado o desbaste de 6 das 10 plantas no estágio fenológico VE e no estágio V1 foram mantidas 2 plantas por vaso. Manteve-se a umidade do solo a 70% da capacidade de retenção de água, por meio de pesagens diárias dos vasos em balança analítica de precisão. Foi feita a inoculação das sementes no sulco de semeadura, por meio da aplicação de 2,0 µL do produto comercial líquido SEMIA 5019 e SEMIA 5079, que contém estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente. Na ocasião da

semeadura, também foi realizada a aplicação de uma solução contendo Mo e Co na dose de 450 e 45 mg kg⁻¹ de semente, respectivamente. Adicionalmente, foi mantida uma planta que não realiza associação simbiótica com bactérias fixadoras de N atmosférico – arroz (*Oriza sativa*), cultivar IAC 201, sendo metade dos vasos com ausência da aplicação de fertilizante nitrogenado e metade com a aplicação da mesma dose de N via solo (20 kg ha⁻¹), como controle para avaliações isotópicas (FRIED; MIDDLEBOE, 1977; BODDEY et al., 2001; URQUIAGA et al., 2012; LAVRES; FRANCO; CÂMARA, 2016).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos ao acaso, com os tratamentos arranjados em esquema fatorial 4 x 5 (quatro formas de aplicação de N x cinco épocas de amostragem), com 5 blocos, totalizando 100 vasos. Neste experimento foram realizadas quatro formas de aplicação de N: I) sem N (controle); II) via solo, no estágio fenológico V1, na forma de ureia (20 kg ha⁻¹ de N, com 5% em átomos de ¹⁵N); III) via foliar, no fim do florescimento (R2), na forma de ureia (2 kg ha⁻¹ de N, com 5% em átomos de ¹⁵N) e IV) via solo em V1 + via foliar no fim do florescimento (R2) na forma de ureia (20 kg ha⁻¹ de N, com 5% em átomos de ¹⁵N) e ureia (2 kg ha⁻¹ de N, com 5% em átomos de ¹⁵N), respectivamente. As plantas foram amostradas destrutivamente em cinco fases dos estádios fenológicos para avaliação da percentagem e quantidade de nitrogênio na planta (raízes, haste, folhas, vagens e grãos) proveniente do fertilizante (NPPF, % e mg/planta), do solo (NPPS, % e mg/planta), da fixação biológica de N (NPPFB, % e mg/planta, sendo eles: V4, R2, R4, R5.4 e R8 (FEHR; CAVINESS, 1977), correspondendo aos 25, 56, 64, 82 e 106 dias após a semeadura (DAS), respectivamente.

Figura 1 – Temperatura máxima e mínima (A) e umidade relativa máxima e mínima (B) diárias na casa de vegetação ao longo do experimento.



As temperaturas e a umidades relativas máxima e mínima na casa de vegetação foram mensuradas diariamente por meio de um termômetro digital a partir dos 13 dias após a semeadura até o fim do ciclo da planta (106 dias após a semeadura) e estão apresentadas nas figuras 1A e 1B.

3.3 Participação do N proveniente da fixação biológica, do fertilizante e do solo

A quantificação da FBN, assim como da absorção do N do fertilizante e do solo, foi realizada pelo método da diluição isotópica. A partir da aplicação de fertilizante enriquecido em ^{15}N e da utilização de uma planta não-fixadora de N, foi possível mensurar a participação relativa de cada um dos três processos em cada parte da planta, no fim do ciclo da soja (R8), a partir dos cálculos propostos por Shearer e Kohl (1986).

$$\%NPPF = \frac{\% \text{ Átomos de } 15\text{N em excesso na soja}}{\% \text{ Átomos de } 15\text{N em excesso no fertilizante}} \times 100$$

$$\%NPPFB = \left(1 - \frac{\% \text{ Átomos de } 15\text{N em excesso na soja}}{\% \text{ Átomos de } 15\text{N em excesso na planta controle}} \right) \times 100$$

$$\%NPPS = 100 - \%NPPF - \%NPPFB$$

$$QNPPF = \%NPPF \times \text{Acúmulo de N}$$

Sendo:

$\%NPPF$ – Porcentagem de N na planta proveniente do fertilizante;

$\%NPPFB$ – Porcentagem de N na planta proveniente da FBN;

$\%NPPS$ – Porcentagem de N na planta proveniente do solo;

$QNPPF$ – Quantidade de N na planta proveniente do fertilizante.

3.4 Remobilização de N

O acúmulo de N em cada parte da planta foram determinadas, conforme cada época de amostragem e a partir das variações dos acúmulos foi possível inferir qual o órgão de residência e dreno-fisiológico (*e.g.*, concentrações diminuindo nas folhas e aumentando nos

grãos). Para tanto, após as coletas de material vegetal, as plantas foram separadas em raízes, haste + pecíolos, folhas (maduras/senescentes e novas/em expansão), vagens e grãos (KHUANKAEW et al., 2010).

3.5 N total

Para cada época de amostragem as plantas foram coletadas e separadas em raízes, haste + pecíolos, folhas (maduras/senescentes e novas/em expansão), vagens e grãos. O material foi colocado em sacos de papel e levado à estufa a 60°C por 72h. Após esse período foram triturados em moinho tipo Wiley e a determinação química de N foi realizada segundo metodologia descrita por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997).

3.6 Massa e número de nódulos

Em cada época de amostragem foram coletados os nódulos das raízes das plantas de soja para quantificação da massa de matéria seca e número dos mesmos. Em seguida, uma parte das amostras foi utilizada para a determinação da atividade da nitrogenase (item 3.9).

3.7 Taxa de assimilação de CO₂

Utilizou-se um analisador portátil de gás infravermelho (*Infrared Gas Analyser – IRGA, LI 6400, Li-Cor, Inc., Lincoln, NE, USA*). O fornecimento de CO₂ foi de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. A intensidade luminosa foi de 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com temperatura da folha mantida a 30°C (FAGAN et al., 2010; REIS et al., 2009; SANTOS et al., 2017). As análises foram feitas no período da manhã, entre 11:00 e 13:00, em dias ensolarados. Foi utilizado o terceiro trifólio para as medições.

3.8 Atividade da nitrato redutase nas folhas

O teste bioquímico da nitrato redutase foi efetuado nos estádios fenológicos R2, R4 e R5.4, no terceiro trifólio expandido, coletado no período da manhã às 8:00, conforme metodologia descrita por Mulder, Boxma e Van Venn (1959).

3.9 Atividade da nitrogenase nos nódulos

Para quantificação indireta da FBN, foi efetuado nos estádios fenológicos R2, R4 e R5.4 o teste de redução do acetileno (ARA), a partir do acondicionamento de 0,5 g de nódulos frescos em frascos de 40 mL, conforme metodologia descrita por Boddey et al. (2001).

3.10 Massa de matéria seca de grãos, parte aérea e raízes

As plantas coletadas em cada época de amostragem foram separadas em raízes, haste + pecíolos, folhas, vagens e grãos. As amostras foram colocadas em sacos de papel e levadas à estufa a 60°C por 72h. Posteriormente, foram pesadas para determinação da massa de matéria seca.

3.11 Componentes de produtividade da soja

Na ocasião da maturação final da soja (estádio fenológico R8, FEHR; CAVINESS, 1977) foram contabilizados o número de vagens por planta, número de grãos por vagem e massa de grãos por planta, considerados os componentes do rendimento da cultura da soja (PEIXOTO et al., 2000), além do número de ramificações por planta.

3.12 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram submetidos às análises estatísticas utilizando-se o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2016). Foi realizada análise de variância e de acordo com o nível de significância no teste F para os tratamentos (formas e épocas de aplicação de N), procedeu ao teste de comparação de médias (*Tukey*, $P < 0,05$) e de regressão entre os tratamentos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Massa de matéria seca

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos para os valores de massa de matéria seca das partes da planta em todas as épocas de coleta e, portanto, não houve efeito das formas de aplicação de N na produção de biomassa da soja (Figura 2).

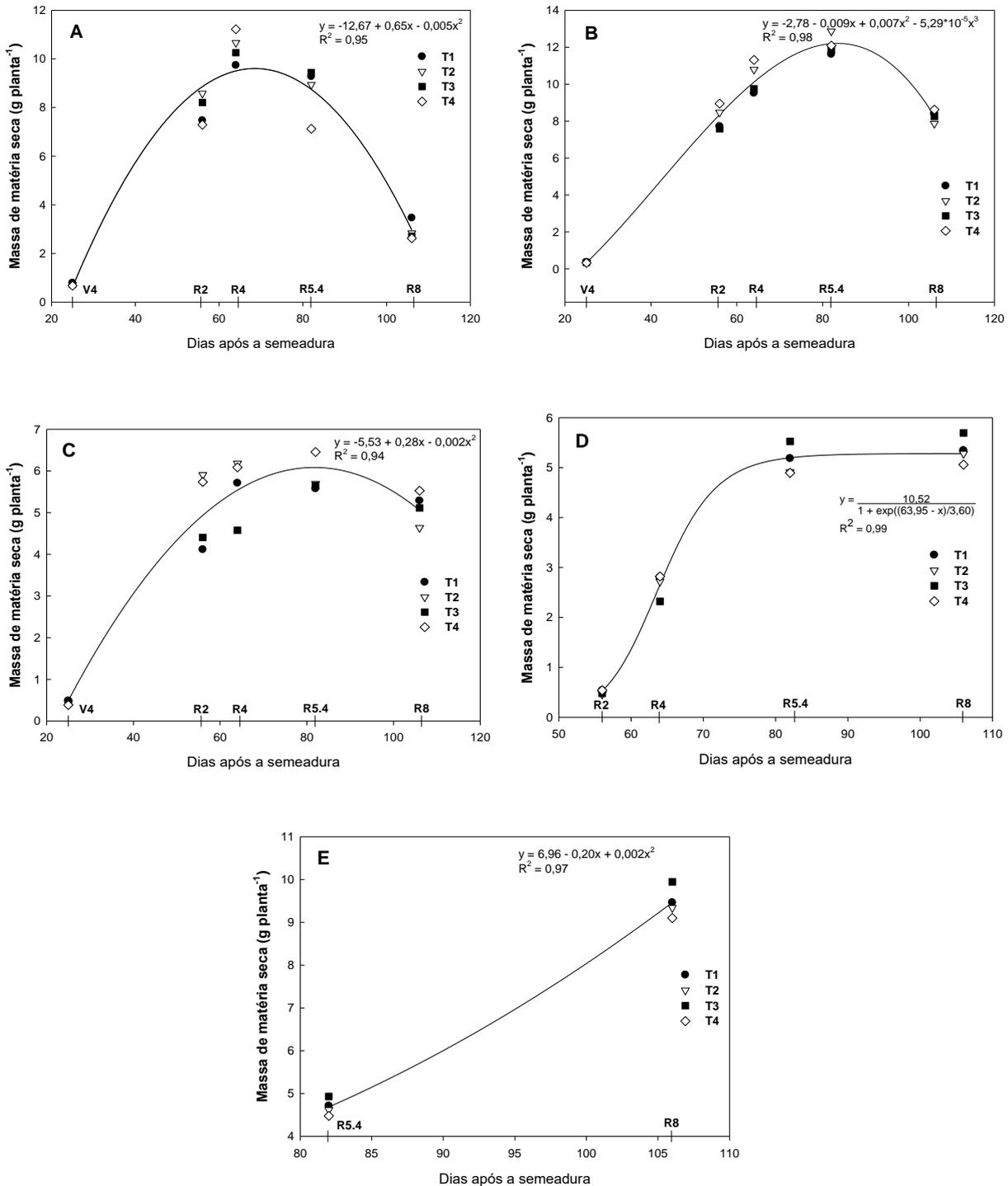
A massa de matéria seca das folhas (Figura 2A) apresentou rápido crescimento na fase vegetativa da soja, atingindo o pico entre os estádios fenológicos R4 e R5.4, ou seja, no período entre a formação de vagens e enchimento de grãos. Após o enchimento de grãos, nota-se uma queda acentuada na massa devido à remobilização de nutrientes (principalmente carbono e N) aos grãos e à consequente senescência das folhas. Martin e Thimann (1972) citaram a redução na concentração total de proteínas solúveis como fator que sucede o processo de senescência das folhas. Thies, Singleton e Bohlool (1995) observaram resultados semelhantes com aplicação de N mineral em plantas de soja e feijão. Tanto em locais com limitação de N disponível no solo, quanto naqueles em que havia N disponível para as plantas, a aplicação de N exerceu efeito insignificante na área foliar específica e na massa de matéria seca de folhas comparado à inoculação exclusivamente.

Para a haste e pecíolos (Figura 2B) também foi observado crescimento elevado da massa de matéria seca na fase vegetativa, porém o crescimento se manteve na fase reprodutiva, uma vez que o cultivar plantado (BMX Potência RR) possui tipo de crescimento indeterminado. Próximo ao estágio fenológico R5.4 houve o pico da produção de biomassa de haste, com posterior queda, provavelmente devido à partição de C (biomassa) e remobilização de nutrientes.

As raízes (Figura 2C) apresentaram a mesma tendência de crescimento de massa de matéria seca na fase vegetativa comparada à das folhas e da haste, com uma atenuação na fase reprodutiva. Após atingir o pico no enchimento de grãos (R5.4), houve uma leve redução na produção de massa de raízes, comportamento que também foi relatado por Ritchie et al. (1994), quando observaram menor desenvolvimento radicular após o início da maturação dos grãos (estádio fenológico R7).

No fim do florescimento (no estágio fenológico R2, FEHR; CAVINESS, 1977) houve predominância de flores, com presença de algumas vagens pequenas nos nós mais baixos das plantas de soja. À medida que as vagens se formaram, houve o incremento na massa de matéria seca das mesmas (Figura 2D), atingindo valor máximo próximo à média granação, o qual se manteve constante até o fim do ciclo da soja (R8).

Figura 2 – Massa de matéria seca das folhas (A), da haste e pecíolos (B), das raízes (C), das flores e vagens (D) e dos grãos (E) das plantas de soja, relacionada às formas de aplicação de N e das épocas de coleta.



A produção de grãos de soja, produto de interesse dos produtores, não foi alterada com a aplicação de nitrogênio mineral (Figura 2E). Na média dos tratamentos, a massa de matéria seca dos grãos aumentou em 102% no período compreendido entre os estádios fenológicos

R5.4 e R8 (24 dias), mostrando que a remobilização de nutrientes é intensa no enchimento de grãos.

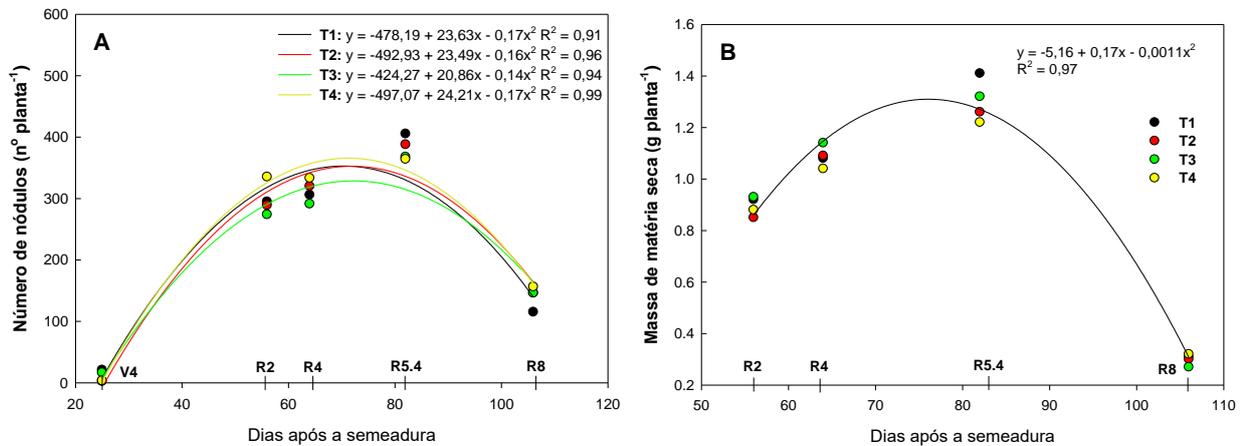
Mendes, Hungria e Vargas (2003), por meio do cultivo de soja em áreas sob plantio direto e convencional, observaram que em duas safras (1998/99 e 1999/2000) a aplicação de ureia no plantio, nas doses de 20, 30 e 40 kg ha⁻¹ de N, não trouxe ganhos na produção de grãos, assim como apresentado neste trabalho (Figura 2E). Por outro lado, Osborne e Riedell (2006) obtiveram ganhos na biomassa de grãos de soja com a aplicação de N mineral no plantio, na forma de ureia e nitrato de amônio. Em dois dos três anos de experimentos, houve acréscimo significativo na massa de grãos quando a dose aplicada foi de 16 kg ha⁻¹ de N, com aumento médio superior a 5%. Todavia, cabe relatar aqui que os autores não mencionaram informações mais detalhadas concernente à inoculação das plantas e aos resultados de nodulação.

4.2 Número e massa de matéria seca de nódulos

Os tratamentos diferiram ($p < 0,05$) entre si apenas no estágio fenológico V4, para o número de nódulos (Figura 3A), quando aquelas plantas que ainda não haviam recebido a aplicação de N (T1 e T3, sem N e N foliar, respectivamente) apresentaram número superior de nódulos nas raízes comparadas àquelas dos tratamentos T2 e T4, nas quais foi aplicada a ureia em V1. Como a nodulação se inicia entre os estádios V1 e V2 (CÂMARA, 2014), o número de nódulos em V4 ainda era pequeno, com média de 18,6 nódulos por planta para os tratamentos sem N em V1 e 2,8 nódulos por planta para os tratamentos com N via solo.

Segundo EMBRAPA SOJA (2013), a aplicação de doses até 20 kg ha⁻¹ de N não afetam a nodulação. Neste trabalho, a aplicação de ureia em V1 impactou negativamente a nodulação em V4, provavelmente por um efeito de alta disponibilidade de N mineral às raízes. Observa-se que na fase reprodutiva da soja, quando a atividade das bactérias fixadoras de N é mais intensa, o número de nódulos de todos os tratamentos não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si, corroborando que a dose de 20 kg ha⁻¹ de N não afeta a nodulação ao longo do ciclo da cultura. Mendes, Hungria e Vargas (2003) encontraram resultados semelhantes na aplicação de doses de 20, 30 e 40 kg ha⁻¹ de N no plantio, onde aos 15 dias após a emergência o tratamento sem N apresentou número de nódulos superior aos demais em dois anos consecutivos, em plantio convencional e direto, mas no pré-florescimento tanto o número quanto a massa de matéria seca de nódulos não foram afetados pela aplicação das três doses de N.

Figura 3 – Número (A) e massa de matéria seca (B) de nódulos nas raízes das plantas de soja, relacionada às formas de aplicação de N e das épocas de coleta.



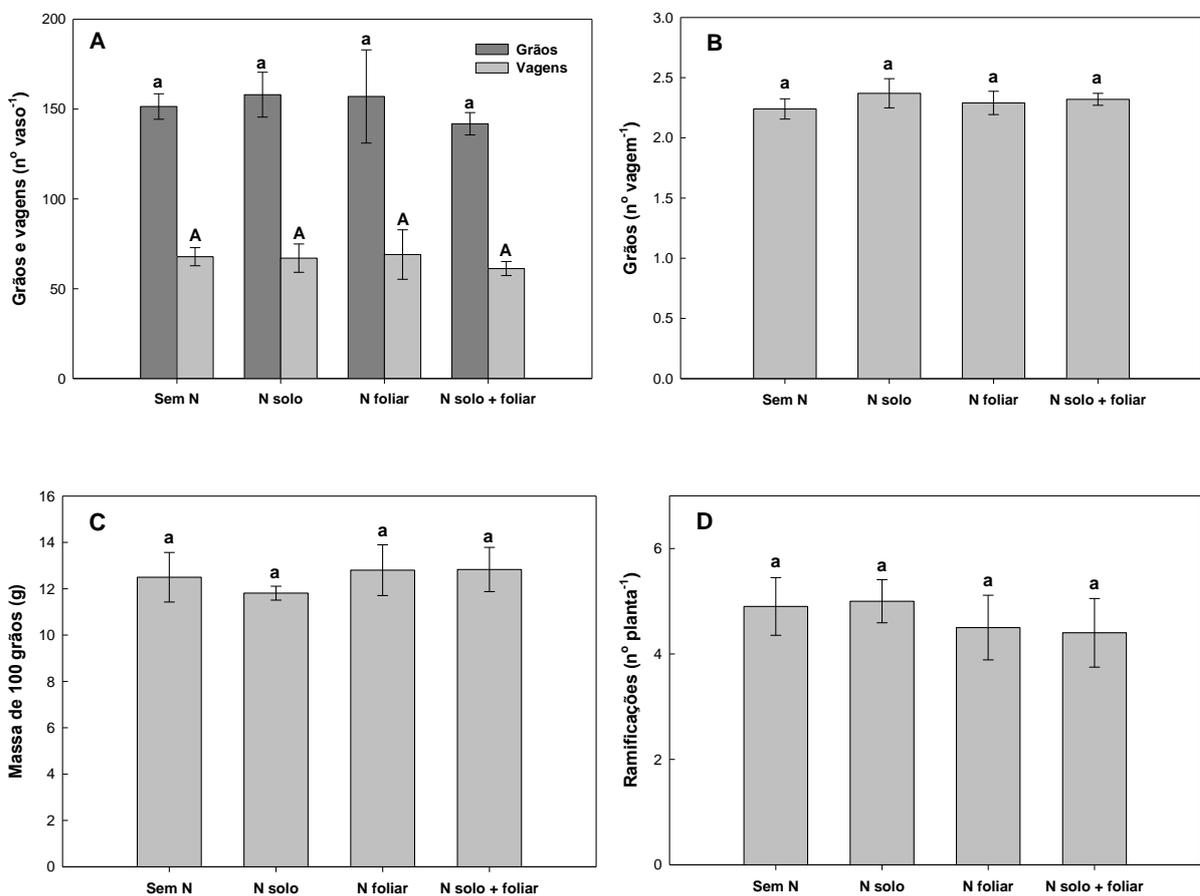
No estágio fenológico V4, devido ao tamanho reduzido dos nódulos, não foi possível obter massa de matéria seca dos mesmos. Portanto, os valores apresentados (Figura 3B) mostram que na fase reprodutiva a massa de matéria seca de nódulos também não sofreu efeito da aplicação de N mineral, uma vez que os tratamentos não diferiram ($p > 0,05$) entre si. Este resultado corrobora com aquele de Mendes et al. (2013), descrito no parágrafo anterior. Kaschuk et al. (2016), porém, observaram uma tendência de redução no número e massa de matéria seca de nódulos no florescimento (R2) com a aplicação de N mineral. No experimento, as doses foram de 30 kg ha⁻¹ de N no plantio e 50 kg ha⁻¹ de N em cobertura no estágio fenológico R1, e como em outros trabalhos, doses superiores a 20 kg ha⁻¹ de N trouxeram impactos negativos à nodulação das raízes de plantas de soja (FRANCO; DA FONSECA; MARRIEL, 1978; SATURNO et al., 2017).

Ainda, pode-se observar que o número de nódulos e a FBN da soja variam conforme o ciclo da cultura, sendo citado por Câmara (2014) que a planta possui dois picos de nodulação e fixação biológica do N: em R2 (florescimento pleno) e em R5.3 (média granação), porém a queda no número e matéria seca de nódulos em R4 não ocorreu neste trabalho (Figura 3). Após R5.3, a atividade da FBN durante o enchimento de grãos é reduzida, visto que é a fase em que há maior demanda de N pela planta e a contribuição da remobilização, a partir da transformação do N-orgânico à NH₄⁺ e novamente formação de glutamina, glutamato e asparagina para a síntese de aminoácidos e proteínas destinados ao enchimento dos grãos (MASCLAUX-DAUBRESSE; REISDORF-CREN; ORSEL, 2008; BENDER; HAEGELE; BELOW, 2015).

4.3 Componentes de produtividade

Nenhum dos componentes de produtividade apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre as formas de aplicação de N (Figura 4). Esse resultado está de acordo com aquele de massa de matéria seca de grãos (Figura 2E), pois plantas de tratamentos com mesmo número de vagens e grãos, grãos por vagem, ramificações na haste principal e mesma massa de 100 grãos não devem diferir quanto à produção de grãos.

Figura 4 – Número de grãos e vagens (A), número de grãos por vagem (B), massa de 100 grãos (C) e número de ramificações na haste principal (D) das plantas de soja, no estágio fenológico R8, relacionados às formas de aplicação de N. Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as formas de aplicação de N, a partir do teste de Tukey a 5% de significância.



Resultados semelhantes foram encontrados por Kubota, Hoshiba e Bordon (2008), ao observarem que aplicação de 50 kg ha^{-1} no plantio de soja não alterou a massa de 100 grãos das plantas. Tahir et al. (2009) avaliaram a aplicação de N e P e a inoculação das sementes de

soja e não obtiveram resposta no número de vagens das plantas que receberam fertilização nitrogenada, nas doses de 25 e 50 kg ha⁻¹, quando houve inoculação.

Gan et al. (2003) também não observaram efeito da aplicação de N mineral, em diferentes estádios fenológicos, no número de grãos por vagem, de ramificações e na massa de 100 grãos das plantas de soja. Porém, quando aplicaram a dose de 50 kg ha⁻¹ nos estádios fenológicos V2 e R1, houve aumento no número de vagens e grãos por planta, o que também levou ao aumento da produtividade da soja. Outro efeito positivo da fertilização nitrogenada nos componentes de produtividade da planta de soja foi encontrado por Mehmet (2008), que notou maiores valores de número de ramificações da haste principal, de vagens por planta, da massa de 100 grãos e da massa total de grãos com a aplicação das doses de 30, 60 e 90 kg ha⁻¹. Entretanto, esse resultado é discutível pois o autor não inoculou as sementes ou o sulco de semeadura, prática indispensável para a boa nodulação das raízes e atividade da FBN.

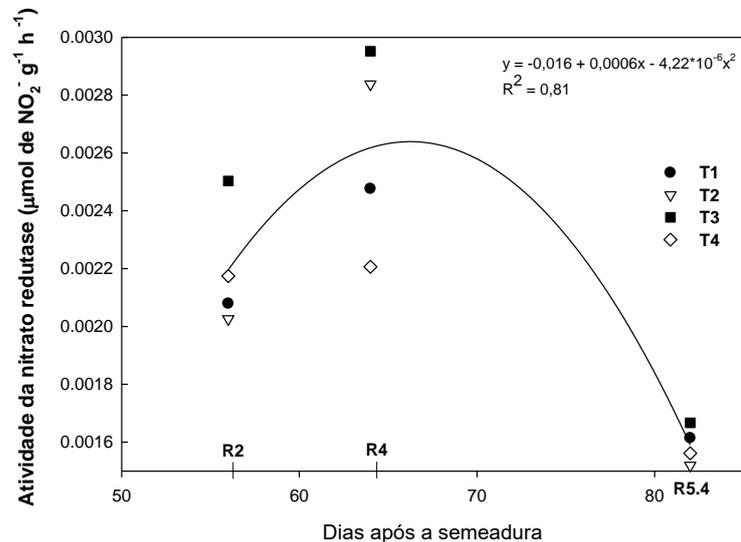
4.4 Atividade da nitrato redutase

Nas três épocas de coleta (R2, R4 e R5.4), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos na atividade da enzima nitrato redutase, havendo apenas efeito do estágio fenológico ($p < 0,05$). A maior atividade foi observada na fase de formação de vagens (R4) e a menor atividade foi verificada próxima à média granação (R5.4) (Figura 5). Esse aumento da atividade da nitrato redutase em R4 pode estar relacionado com a redução na FBN, aumentando a participação do N-NO₃⁻ na absorção e transporte de nitrogênio pela planta. Câmara (2014) citou que o pico de nodulação em R2 fornece grande quantidade de N para a planta, que é armazenado nos tecidos da haste principal e suas ramificações, sendo remobilizado para as estruturas reprodutivas e reduzindo a alta demanda pelas atividades de fotossíntese e FBN nos estádios fenológicos R3 e R4. No entanto, Franco, Da Fonseca e Marriel (1978) observaram o pico de atividade da nitrato redutase nas folhas no florescimento, com decréscimo na fase de formação de vagens.

A nitrato redutase também pode ser encontrada nas raízes e nódulos da planta de soja, reduzindo o NO₃⁻ e iniciando o processo assimilatório de N antes de chegar nas folhas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Franco, Da Fonseca e Marriel (1978) verificaram maior atividade da enzima nos nódulos comparado às folhas, na fase reprodutiva da cultura. Hunter (1983) também observou alta quantidade da enzima nos nódulos, porém a atividade foi maior nas raízes, indicando que o nódulo não corresponde ao principal local de redução de nitrato na planta. Essas observações podem explicar os baixos valores de atividade

da nitrato redutase no presente estudo (Figura 5) comparado a outros trabalhos (FRANCO; DA FONSECA; MARRIEL, 1978; HARPER; HAGEMAN, 1972).

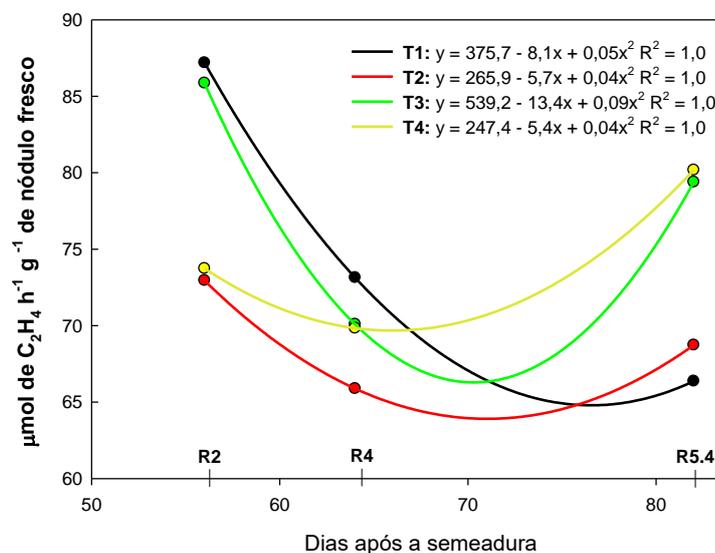
Figura 5 – Atividade da enzima nitrato redutase nas folhas das plantas de soja, relacionada às formas de aplicação de N e das épocas de coleta.



4.5 Atividade da nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase diferiu ($p < 0,05$) entre os tratamentos apenas no estágio fenológico R2 (florescimento pleno), considerado um pico de nodulação e FBN da soja (CÂMARA, 2014). Os nódulos das plantas dos tratamentos que não receberam a aplicação de N mineral via solo em V1 foram aqueles que apresentaram maiores valores de redução do acetileno em R2, ou seja, atividade de fixação do N₂ atmosférico elevada em relação aos tratamentos que receberam a aplicação de ureia via solo (Figura 6). Apesar da fertilização nitrogenada não ter afetado o número e a massa de matéria seca de nódulos no florescimento (Figura 3), houve um efeito adverso na atividade da enzima nitrogenase, que pode estar relacionado à maior concentração de NO₃⁻ na solução do solo, que diminui a permeabilidade do córtex dos nódulos e resulta em diminuição da disponibilidade de O₂ para a respiração nodular, além da redução da afinidade da leghemoglobina com o O₂ (DENINSON; HARTER, 1995).

Figura 6 – Atividade da enzima nitrogenase nos nódulos das raízes das plantas de soja, relacionada às formas de aplicação de N e das épocas de coleta.



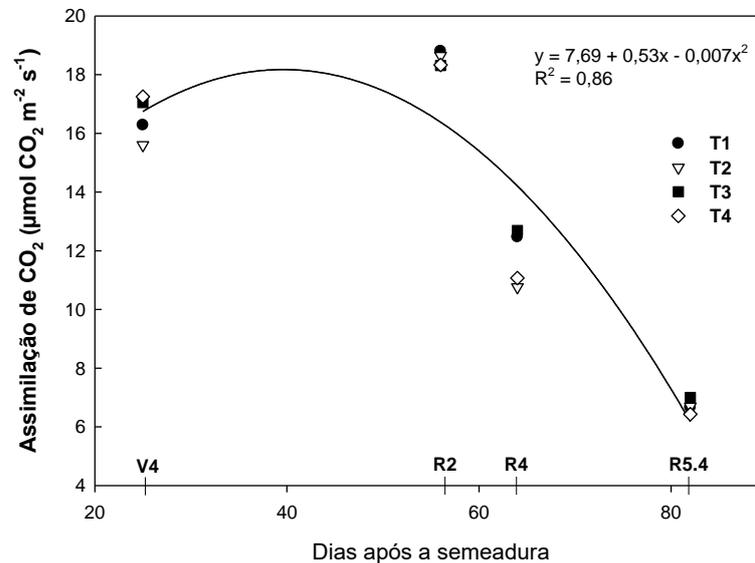
Stephens e Neyra (1983) observaram a redução de 50% a 65% na atividade da nitrogenase em nódulos destacados de soja com a exposição ao nitrato e ao nitrito, porém também notaram que a adição de sacarose estimulou o aumento da atividade da enzima tanto na presença como na ausência de nitrato e nitrito, o que pode explicar a ausência de efeito da aplicação do N mineral via solo em R4 e R5.4 (Figura 6), após um pico de assimilação de CO_2 e, conseqüentemente, de produção e translocação de fotoassimilados (Figura 7).

No estágio fenológico R4 houve uma redução na atividade da nitrogenase em todos os tratamentos, sendo mais acentuada naqueles que apresentaram maiores valores em R2. Como o estágio corresponde ao período de formação de vagens, Lawn e Brun (1974) atribuíram essa redução à competição dos nódulos com as vagens e sementes por fotoassimilados, reduzindo também o suprimento de energia aos nódulos. Entre os estádios fenológicos R4 e R5.4, os tratamentos que receberam a aplicação de N via foliar em R2 apresentaram aumento na atividade da nitrogenase nos nódulos.

4.6 Taxa de assimilação de CO_2

Houve diferença ($p < 0,05$) apenas entre os estádios fenológicos em que foram realizadas as medições, ou seja, a aplicação de N mineral nas doses utilizadas não alterou a taxa de assimilação de CO_2 pelas folhas das plantas de soja (Figura 7). Esse resultado concorda com aquele encontrado por Li e Gupta (1993), que não observaram alterações na atividade fotossintética das plantas de soja com a aplicação de N, em diferentes concentrações de CO_2 .

Figura 7 – Assimilação de CO₂ nas folhas das plantas de soja BMX Potência RR, em função das formas de aplicação de N e das épocas de coleta.



A associação dos rizóbios com as plantas representa um consumo de 9% a 14% da produção de fotoassimilados, pois as bactérias se tornam outro dreno de C para a planta (KASCHUK et al., 2009). Portanto, o gasto energético de uma planta nodulada é maior do que aquele de uma planta não-nodulada ou com menos nódulos e, conseqüentemente, a translocação de fotoassimilados para os grãos e a produtividade podem ser menores. Porém, Kaschuk et al. (2010) notaram que houve um aumento na taxa fotossintética líquida de plantas de soja noduladas em comparação às não-noduladas, compensando os custos de C da FBN. No presente trabalho, não ocorreu maior assimilação de CO₂ nas plantas que não receberam aplicação de N mineral, pois a nodulação (Figura 3) não foi afetada nos outros tratamentos.

A maior taxa de assimilação de CO₂ foi observada no florescimento (R2) (Figura 7), que segundo Câmara (2014) se deve à alta demanda de C pela carga de flores presente neste estágio fenológico. Na granação (R5.4), nota-se os menores valores de assimilação de CO₂, pois neste estágio já havia iniciado o processo de senescência das folhas, devido à translocação de fotoassimilados e nutrientes para os grãos, entre eles o N, tendo como uma das fontes a degradação da clorofila (KASCHUK et al., 2010). Kaschuk et al. (2010) ainda observaram que plantas noduladas mantiveram as concentrações de clorofila altas até o enchimento de grãos, enquanto que as não-noduladas e com suprimento de N mineral apresentaram redução na concentração de clorofila já no florescimento.

4.7 Concentração e acúmulo de N

A concentração de N nas folhas pouco variou em função das formas de aplicação de N até o estágio R5.4, quando se observou maior concentração de N nas folhas novas dos tratamentos que não receberam N via solo em V1, em comparação ao tratamento que recebeu apenas a ureia via solo (Tabela 1). Isso pode ter acontecido pelo fato das plantas cultivadas em menor disponibilidade de N no solo atrasarem a remobilização de N das folhas, por meio da degradação de compostos nitrogenados como a clorofila, e conseqüentemente sua senescência, como observado por Kaschuk et al. (2010). Porém, em todas as formas de aplicação de N, houve redução gradativa da concentração de N das folhas a partir de R2 até o fim do ciclo da soja.

Na haste e nos pecíolos a redução na concentração de N ao longo do ciclo foi menor, começando em R4. Entre os estádios V4 e R2 a diminuição se deve ao efeito concentração e diluição, quando em V4 o baixo acúmulo de N (Tabela 2), porém em uma pequena massa de matéria seca (Figura 2B), resultou em alta concentração de N, enquanto que no florescimento ambos o acúmulo e a massa de matéria seca eram altos, resultando em menor concentração de N. Assim como nas folhas, na haste e nos pecíolos a concentração de N sofreu maior redução primeiro nos tratamentos que receberam N via solo, iniciando já na fase de formação de vagens (R4).

Nas raízes, a concentração de N sofreu pouca alteração ao longo do ciclo, em todas as formas de aplicação de N, sugerindo que não contribuam muito com a remobilização de N aos grãos. Também não se observou diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), exceto em R4 quando o tratamento com N foliar apresentou maior concentração de N que aquele com N via solo.

Tabela 1 – Concentração de N nas diferentes partes das plantas de soja, relacionada às formas de aplicação de N e das épocas de coleta.

Concentração de N (g kg ⁻¹)													
Tratamento	Folhas		Folhas novas			Folhas velhas			Haste + Pecíolos				
	V4	R8	R2	R4	R5.4	R2	R4	R5.4	V4	R2	R4	R5.4	R8
Sem N	53,28 Bb	9,63 Aa	47,95 Aa	24,73 Ba	16,60 Ca	25,19 Ab	18,37 Ba	12,84 Ca	23,22 Ab	11,00 BCa	12,49 Bab	11,45 Ca	5,52 Db
N solo	45,83 Bb	9,90 Aa	47,49 Aa	25,82 Ba	14,07 Cb	28,27 Ab	18,33 Ba	13,64 Ca	29,73 Aa	11,15 BCa	10,96 Bb	9,12 Cb	5,12 Db
N foliar	44,81 Bb	9,68 Aa	50,77 Aa	26,92 Ba	16,54 Ca	32,28 Aa	19,35 Ba	14,13 Ca	22,91 Ab	12,21 BCa	14,26 Ba	10,55 Ca	5,57 Db
N solo + foliar	68,62 Ba	9,72 Aa	47,57 Aa	23,95 Ba	15,17 Cab	27,70 Ab	17,66 Ba	12,71 Ca	30,37 Aa	11,08 BCa	12,08 Bb	7,80 Cc	6,68 Da

Tratamento	Raízes					Flores/Vagens				Grãos	
	V4	R2	R4	R5.4	R8	R2	R4	R5.4	R8	R5.4	R8
Sem N	25,04 Aa	12,67 BCa	13,97 Bab	10,76 Ca	13,79 Ba	23,31 Ba	30,95 Aab	15,18 Ca	8,85 Da	59,14 Aab	60,65 Aa
N solo	24,98 Aa	14,19 BCa	11,71 Bb	10,18 Ca	12,78 Ba	25,93 Ba	31,50 Aa	14,93 Ca	8,88 Da	62,56 Aa	61,58 Aa
N foliar	23,52 Aa	13,22 BCa	14,48 Ba	10,20 Ca	15,20 Ba	26,91 Ba	26,96 Ab	15,99 Ca	9,19 Da	56,00 Bb	61,43 Aa
N solo + foliar	25,35 Aa	12,33 BCa	13,14 Bab	12,14 Ca	12,84 Ba	24,30 Ba	28,16 Aab	15,25 Ca	9,51 Da	62,99 Aa	60,67 Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as épocas de coleta e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as formas de aplicação de N, a partir do teste de Tukey a 5% de significância

Tabela 2 – Acúmulo de N nas diferentes partes das plantas de soja, relacionado às formas de aplicação de N e das épocas de coleta

Acúmulo de N (mg planta ⁻¹)														
Tratamento	Folhas					Haste + Pecíolos					Flores/Vagens			
	V4	R2	R4	R5.4	R8	V4	R2	R4	R5.4	R8	R2	R4	R5.4	R8
Sem N	43,75 Dab	221,28Ab	208,24 Ba	128,19 Ca	33,38 Da	8,53 Da	84,43 Ba	118,24 Aa	130,59 Aa	47,75 Ca	12,92 Ca	88,05 Aa	77,09 Aa	46,57 Ba
N solo	32,52 Db	270,39 Aab	214,61 Ba	123,40 Ca	28,17 Da	10,09 Ca	93,83 Aa	118,31 Aa	117,05 Aab	40,65 Ba	13,16 Ca	85,28 Aab	73,64 Aa	48,03 Ba
N foliar	32,65 Db	297,94 Aa	223,15 Ba	140,89 Ca	26,49 Da	7,91 Da	92,78 Ba	137,36 Aa	126,57 Aa	46,24 Ca	14,27 Ca	62,42 Ab	88,99 Aa	52,53 Ba
N solo + foliar	45,72 Da	272,11 Aab	216,12 Ba	108,15 Ca	25,43 Da	9,85 Da	99,25 Ba	136,49 Aa	94,25 Bb	57,74 Ca	13,26 Ca	79,02 Aab	75,32 Aa	48,46 Ba

Tratamento	Raízes					Grãos		Total				
	V4	R2	R4	R5.4	R8	R5.4	R8	V4	R2	R4	R5.4	R8
Sem N	11,58 Ba	57,15 Ab	78,09 Aa	64,03 Aa	69,88 Aa	282,35 Ba	575,67 Aa	63,87 Eab	375,77 Db	492,62 Ca	682,26 Ba	773,25 Aa
N solo	10,80 Ba	83,72 Aa	71,91 Aa	58,37 Aa	59,53 Aa	289,41 Ba	576,72 Aa	53,41 Eab	461,11 Da	490,11 Ca	661,88 Ba	753,11 Aa
N foliar	10,87 Ba	57,45 Ab	65,41 Aa	57,59 Aa	77,61 Aa	275,29 Ba	611,04 Aa	51,43 Eb	462,43 Da	488,34 Ca	689,33 Ba	813,91 Aa
N solo + foliar	9,37 Ba	70,11 Aab	78,56 Aa	78,38 Aa	72,71 Aa	281,49 Ba	552,44 Aa	64,94 Ea	454,73 Dab	510,2 Ca	637,58 Ba	756,77 Aa

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as épocas de coleta e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre as formas de aplicação de N, a partir do teste de Tukey a 5% de significância

A concentração de N nas flores e vagens não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre as formas de aplicação de N, exceto em R4. Na ocasião da formação de vagens, o tratamento com ureia via solo apresentou concentração de N superior ao tratamento com ureia via foliar nas estruturas reprodutivas da planta. Há indícios que essa maior concentração esteja relacionada à redução mais precoce das concentrações de N de folhas novas e haste nesse tratamento, comparado àquele com aplicação de N foliar, resultando na remobilização de N para as flores e vagens entre o florescimento e a frutificação da soja. Após o estágio fenológico R4, houve redução na concentração de N das vagens até o fim do ciclo, sugerindo que houve alta remobilização de N para os grãos.

No estágio fenológico R5.4 a concentração de N nos grãos dos tratamentos com N via solo e N via solo + foliar foi maior ($p < 0,05$) que aquela do tratamento com N exclusivamente via foliar, reforçando a ideia da remobilização mais precoce de N das folhas novas e da haste nos tratamentos com N via solo, pois no fim do ciclo a concentração de N nos grãos não diferiu ($p > 0,05$) entre as formas de aplicação de N.

Em R8, exceto na haste e pecíolos, as concentrações de N não diferiram ($p > 0,05$) entre os tratamentos, ou seja, as variadas formas de aplicação de fertilizante nitrogenado não resultaram em aumento na concentração de N das partes das plantas. Osborne e Riedell (2006) observaram aumento na concentração de N na planta em V3/V4 com a aplicação de doses de 8, 16 e 24 kg ha⁻¹ de N no plantio via solo, porém em R1 e R3 não houve diferença entre os tratamentos, assim como na concentração de N nos grãos no fim do ciclo da soja. Saturno et al. (2017), avaliando a aplicação de doses de N em solução nutritiva no desenvolvimento das plantas de soja, observaram um aumento linear da concentração de N na parte aérea das plantas com o aumento da dose, em plantas coletadas aos 35 dias após emergência (DAE). Porém, ao cultivar soja em vasos contendo terra, as plantas aos 52 DAE não responderam à aplicação de ureia e nitrato de amônio, quanto à concentração de N na parte aérea.

O acúmulo de N nas folhas cresceu de 5 a 9 vezes entre os estádios fenológicos V4 e R2 sob as diferentes formas de aplicação de N (Tabela 2), mostrando que as plantas armazenam grande quantidade de N nas folhas durante a fase vegetativa. A haste e os pecíolos também acumulam bastante N em seus tecidos, porém aproximadamente três vezes menos que as folhas, apesar da massa de matéria seca semelhante das duas estruturas vegetativas (Figuras. 2A e 2B). Isso sugere que a planta de soja esteja preparada para a alta demanda de N pelas estruturas reprodutivas, principalmente o enchimento de grãos.

Nas raízes, observou-se aumento do acúmulo de N apenas na fase vegetativa, entre V4 e R2, mantendo-se constante durante a fase reprodutiva até o fim do ciclo, indicando que não houve degradação de compostos nitrogenados visando a remobilização de N às estruturas reprodutivas e aos grãos.

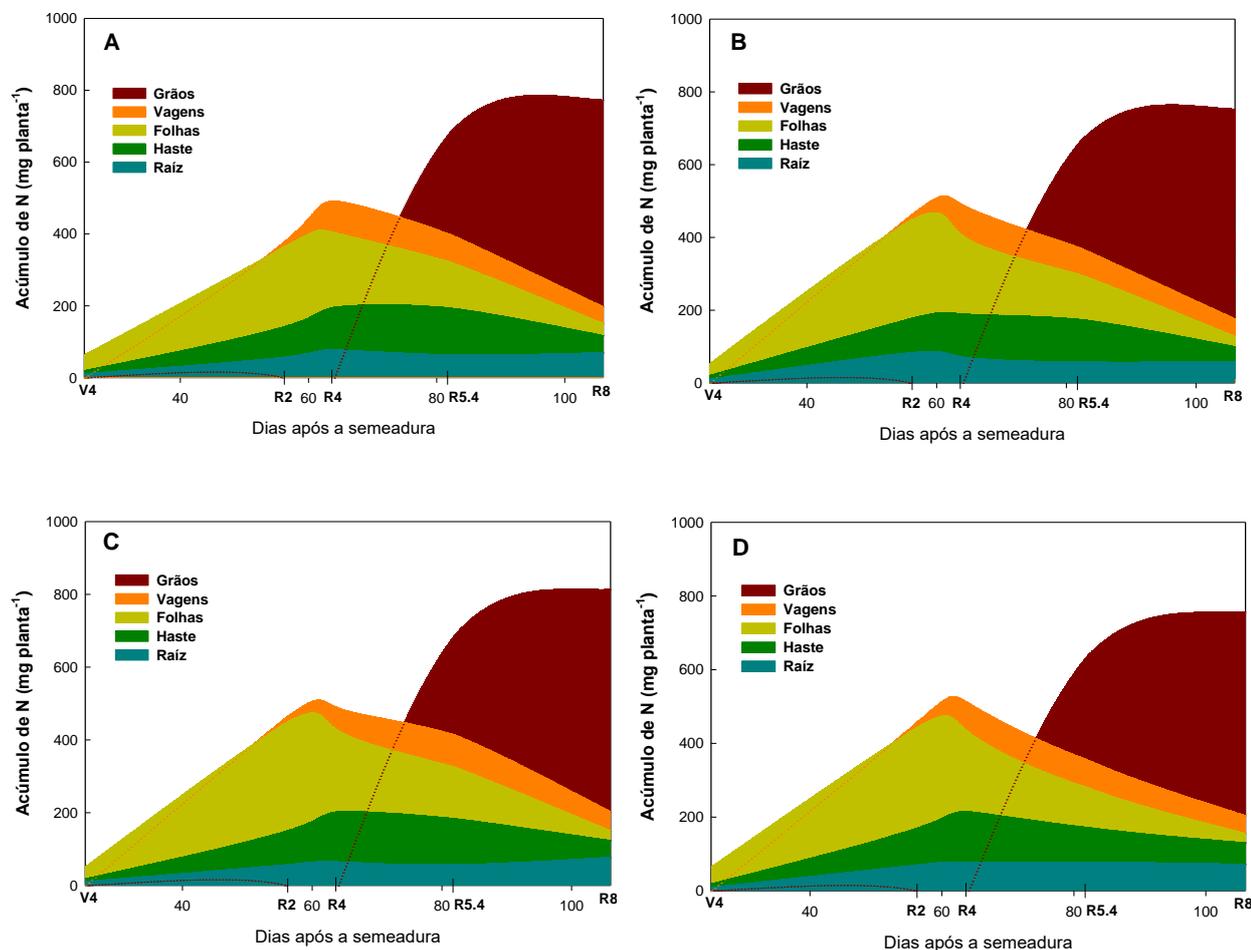
No fim do ciclo das plantas de soja, não foi observada diferença ($p>0,05$) no acúmulo de N entre as formas de aplicação de N para nenhuma parte da planta. Diferenças entre os tratamentos foram encontradas ao longo do ciclo para determinadas partes da planta, porém não resultaram em acúmulos superiores ou inferiores de N, nem em diferenças na produção de grãos (Figura 2E) em R8. Dessa forma, nas condições do experimento, a aplicação de ureia via solo e via foliar em V1 e R2, respectivamente, assim como sua combinação, não estimularam a planta de soja a acumular mais N.

Saturno et al. (2017) também não obtiveram diferença no acúmulo de N nas plantas de soja de tipo de crescimento indeterminado, aos 52 DAE, entre tratamentos sem e com N mineral, sendo que em condição de aplicação do fertilizante nitrogenado apenas no plantio, via solo, o acúmulo foi menor em comparação às plantas cultivadas sem aplicação de N mineral. Quando utilizaram genótipo de tipo de crescimento determinado, o tratamento sem aplicação de N foi o que apresentou maior acúmulo de N em relação aos demais. O mesmo foi observado por Barker e Sawyer (2005), que apesar de notarem um aumento na concentração de N da planta com a aplicação de ureia e ureia revestida, não verificaram diferença no acúmulo de N na planta e nos grãos entre tratamentos sem e com aplicação de N. Franco, Da Fonseca e Marriel (1978), por outro lado, encontraram aumento no acúmulo de N em plantas que receberam fertilizante nitrogenado via solo, porém sem incremento na produção de grãos.

4.8 Remobilização de N

Os grãos de soja contêm cerca de 40% de proteína (LAZZAROTTO; HIRAKURI, 2010), portanto a demanda de N é muito alta. Além da absorção radicular do nutriente durante a formação e enchimento dos grãos, a remobilização de N das outras partes da planta contribui para a síntese proteica. Kichey et al. (2007) verificaram que 71% do N acumulado nos grãos de arroz vieram da remobilização. A Figura 8 mostra que nas quatro formas de aplicação de N, o acúmulo de N nas diversas partes da planta foi reduzido com o aumento do acúmulo nos grãos, indicando a ocorrência da remobilização de N na fase reprodutiva.

Figura 8 – Acúmulo de N ao longo do ciclo, nas diferentes partes das plantas de soja, para os tratamentos sem aplicação de N mineral (A), 20 kg ha⁻¹ de N via solo (B), 2 kg ha⁻¹ de N via foliar (C) e 20 kg ha⁻¹ de N via solo + 2 kg ha⁻¹ de N via foliar (D).



A grande redução no acúmulo de N das folhas após o pico na formação de vagens (R4) e da haste a partir do enchimento de grãos (R4-R5.4) sugere que a planta de soja acumula N durante a fase vegetativa de modo a suprir a demanda de N das vagens e dos grãos quando há redução na atividade da FBN e na absorção de N do solo na fase de enchimento de grãos (SALON et al., 2001). Também foi observado que as vagens apresentaram redução no acúmulo de N após a granação da soja, um indício de que elas também contribuem com a remobilização de N aos grãos. Os tecidos das raízes, entretanto, não demonstraram ser fontes de remobilização de N para os grãos, uma vez que o acúmulo de N se manteve constante na fase reprodutiva da cultura.

Os tratamentos que receberam aplicação de N via solo em V1 apresentaram queda no acúmulo de N na haste e nos pecíolos mais precoce em comparação àqueles que não receberam, sustentando a hipótese que a maior disponibilidade de N para absorção radicular

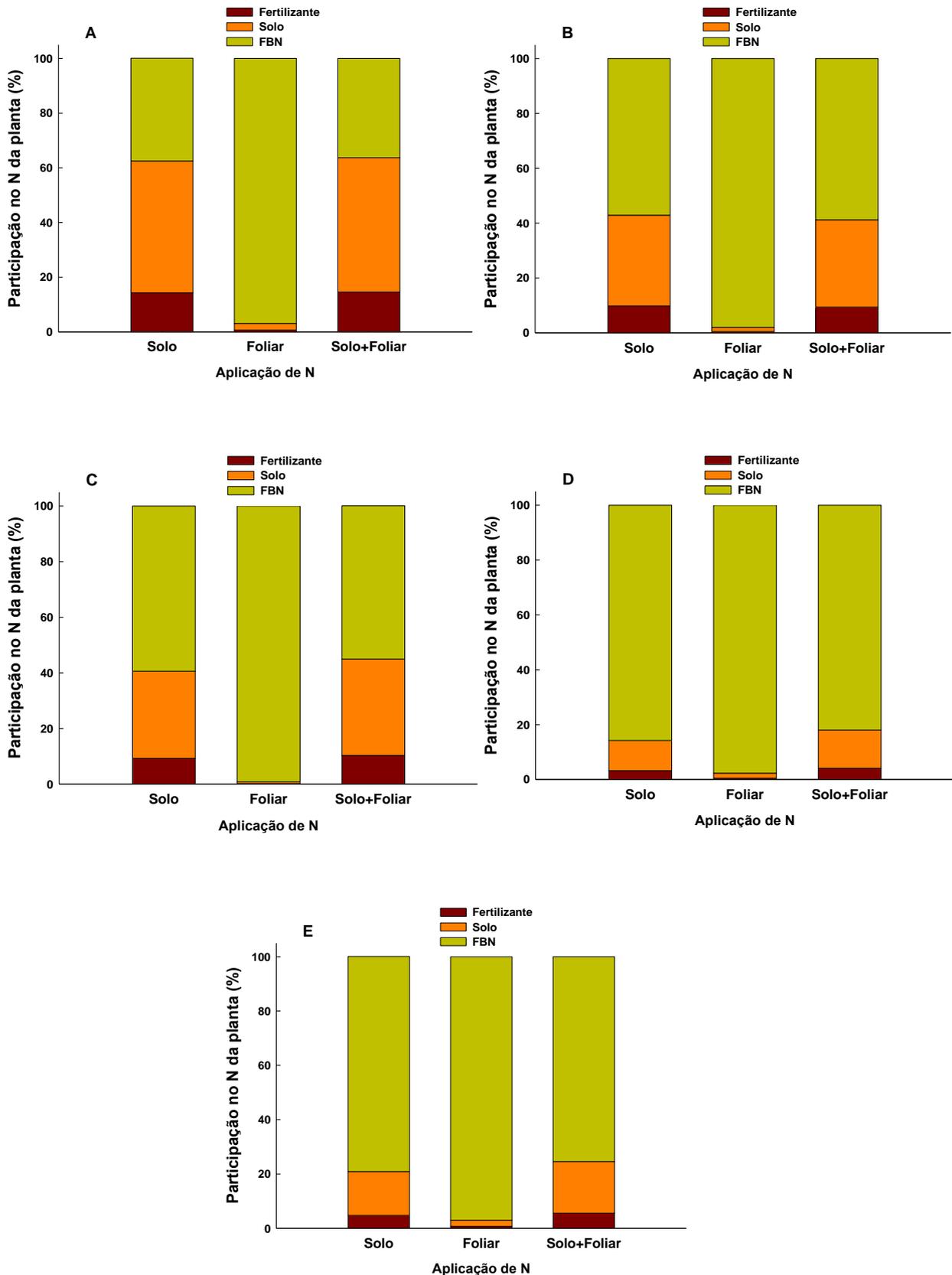
acelera o processo de remobilização de N dos órgãos vegetativos aos reprodutivos e, conseqüentemente, a senescência (KASCHUK et al., 2010). Apesar da dose aplicada no solo não ter sido alta em comparação à maioria dos trabalhos citados ao longo dos resultados e discussão, as análises isotópicas de ^{15}N indicam que houve aumento na disponibilidade de N nativo do solo com a aplicação de ureia via solo, devido à alta participação do N-solo no N-total das partes da planta desses tratamentos (Figura 9).

4.9 Contribuição das fontes de N

Como as plantas do tratamento sem aplicação de N não receberam o fertilizante marcado com o isótopo ^{15}N , não foi possível calcular as contribuições por meio do método de diluição isotópica. Também não foi possível efetuar os cálculos pelo método da abundância natural ($\delta^{15}\text{N}$) porque há contaminação por parte dos tratamentos que receberam a aplicação do fertilizante marcado, devido principalmente à reabsorção pelas folhas do N volatilizado (FENILLI et al., 2007; HUTCHINSON; MILLINGTON; PETERS, 1972).

O tratamento com aplicação de N foliar no florescimento (R2) foi aquele que apresentou maior contribuição relativa do N-FBN no N total de todas as partes da planta, em R8, variando de 96,2% a 99,1%. A contribuição do N-fertilizante no N total das raízes foi menor em comparação às demais partes da planta (Figura 9), uma vez que a ureia foi aplicada nas folhas e na fase reprodutiva da soja, quando as vagens e grãos atuam como forte dreno fisiológico (MASTRODOMENICO; PURCELL, 2012). Porém, a contribuição do N-fertilizante neste tratamento não excedeu 1% em nenhuma das partes da planta, além de não elevar a produção de biomassa, as atividades das enzimas nitrato redutase e nitrogenase e nem a assimilação de CO_2 (Figuras 2, 5, 6 e 7), ou seja, nas condições do experimento não se justificou a aplicação de N foliar em R2.

Figura 9 – Contribuição (%) do fertilizante, do solo e da FBN no N total das folhas (A), da haste (B), das raízes (C), das vagens (D) e dos grãos (E) das plantas de soja, relacionada às formas de aplicação de N, no estágio fenológico R8.



Em um experimento em campo, Saturno et al. (2017) observaram que tanto as doses de 5, 10 e 15 kg ha⁻¹ de N via foliar como as doses de 50, 100 e 200 kg ha⁻¹ de N via solo em R5.3 (média granação) não elevaram a produção de grãos de dois cultivares de soja, sendo um de tipo de crescimento determinado e outro indeterminado, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho. Barker e Sawyer (2005) testaram a aplicação de N via solo na formação de vagens de soja (entre os estádios fenológicos R3 e R4), nas doses de 45 e 90 kg ha⁻¹ de N, utilizando ureia e ureia com revestimento de liberação controlada. Os autores também não obtiveram resposta positiva, sem incremento na produção e na qualidade dos grãos. Esses resultados reforçam a hipótese da ineficiência da aplicação de N mineral na fase reprodutiva da soja.

As contribuições relativas do N-fertilizante no N total das partes das plantas dos tratamentos que receberam a aplicação de N via solo em V1 foram semelhantes, de modo que aquele que recebeu a aplicação adicional de N via foliar em R2 apresentou acréscimo de 0,3%, 1,0%, 1,1% e 1,2% na contribuição do N-fertilizante nas folhas, raízes, vagens e grãos, respectivamente. Na haste não houve aumento da participação do N-fertilizante com a aplicação de N foliar nos tratamentos que receberam N via solo previamente. Portanto, a aplicação de N na fase reprodutiva da soja, seja quando a planta recebeu ureia no início do ciclo ou não, não teve contribuição significativa no acúmulo de N na soja.

A aplicação de N mineral via solo em V1 elevou a absorção do N do solo. No tratamento apenas com N foliar, a contribuição relativa do N-solo no N-total das partes da planta variou de 0,7% a 2,9%, enquanto que nos tratamentos com N via solo e N via solo + foliar a variação foi de 11,0% a 48,2% e de 13,9% a 49,1%, respectivamente. Segundo Jenkinson, Fox e Rayner (1985), isso se refere ao “efeito *priming*”, quando a adição de fertilizante nitrogenado eleva as taxas de mineralização de N do solo, fazendo com que plantas cultivadas em solos fertilizados com N absorvam mais N nativo do solo em comparação às plantas cultivadas em solos sem aplicação de fertilizante nitrogenado.

Na Figura 9, pode ser observado que em todos os tratamentos e em todas as partes da planta no estágio fenológico R8, exceto nas folhas dos tratamentos com aplicação de N via solo, a FBN contribuiu com a maior parcela do N-total. A contribuição relativa do N-FBN nos grãos foi superior àquelas das demais fontes de N, corroborando os resultados obtidos por Lavres, Franco e Câmara (2016) e Mastrodomenico e Purcell (2012), ao concluírem que mais de 90% do N dos grãos foi proveniente da FBN.

Nota-se que nos tratamentos com N via solo e N via solo + foliar há uma grande redução na contribuição relativa do N-fertilizante no N-total das vagens e grãos comparada àquela das partes vegetativas da planta (folhas, haste e raízes), em R8 (Figura 9). Portanto, mesmo quando se aplicou N mineral via solo, a maior parcela do N destinado aos órgãos reprodutivos da planta de soja veio da FBN e não da ureia, com maior contribuição relativa do N-fertilizante nos resíduos vegetais.

Tabela 3 – Composição isotópica de N, em % de átomos de ^{15}N , das partes das plantas de soja que não receberam aplicação de N mineral, no estágio fenológico R8.

Composição isotópica (% átomos ^{15}N)					
Tratamento	Folhas	Haste	Raízes	Vagens	Grãos
Sem N	0,3777	0,3681	0,3719	0,3669	0,3661

Este mesmo comportamento foi observado para o tratamento sem aplicação de N. Apesar da impossibilidade do cálculo de contribuição pelo método da diluição isotópica, também foi feita a análise da composição isotópica das partes da planta desse tratamento e foi verificado que a maior quantidade relativa de ^{15}N foi encontrada nas folhas, enquanto que a menor foi observada nas vagens e nos grãos (Tabela 3), sustentando a hipótese da maior contribuição do N-FBN no N-total das estruturas reprodutivas da soja. Isso porque o N do solo é mais rico em ^{15}N que o ar atmosférico, devido às diversas transformações físico-químicas e biológicas, enquanto que o N da fixação do N_2 é mais pobre em ^{15}N que o ar atmosférico (0,3663%), portanto menores valores de % em átomos de ^{15}N na planta sugerem maior participação do N proveniente da FBN (SHEARER; KOHL, 1986).

As plantas do tratamento que recebeu apenas a aplicação de N foliar em R2 foram aquelas que destinaram maior parcela do N absorvido do fertilizante aos grãos (83,5%), enquanto que as plantas dos tratamentos com N via solo e N via solo + foliar destinaram 70,6% e 69,8% do total absorvido aos grãos, respectivamente (Tabela 4). A aplicação da ureia nas folhas provoca a absorção do N por um órgão-fonte próximo ao dreno (vagens e grãos), fazendo com que a maior parte desse nutriente seja remobilizado às estruturas reprodutivas.

Tabela 4 – Quantidade de N proveniente do fertilizante nas partes das plantas de soja e recuperação do N do fertilizante pelas plantas, em função das formas de aplicação de N, no estágio fenológico R8.

Tratamento	QNPPF (mg)					Total	Recuperação (%)
	Folhas	Haste	Raízes	Vagens	Grãos		
N solo	3,95	3,86	5,27	1,46	34,96	49,51	30,01
N foliar	0,22	0,26	0,19	0,33	5,03	6,02	36,50
N solo + foliar	3,78	5,36	7,37	1,93	41,70	59,76	32,93

Com exceção dos grãos, as raízes apresentaram o maior acúmulo de N proveniente do fertilizante nas plantas dos tratamentos que receberam a aplicação de ureia em V1 via solo, em R8. Além de ser o órgão da planta diretamente relacionado à absorção do nutriente do solo, é aquele que teve menor participação na remobilização de N aos grãos (Figura 8), como discutido anteriormente no item “Remobilização de N”, explicando os maiores valores de QNPPF apresentados na Tabela 4. Por outro lado, a média dos valores de QNPPF das raízes em R8 no tratamento apenas com N foliar foi a menor comparada às outras partes da planta, devido à aplicação do fertilizante distante do sistema radicular da soja.

A recuperação do fertilizante aplicado pelas plantas variou de 30,01% a 36,50% entre os três tratamentos (Tabela 4). A aplicação exclusiva de ureia foliar foi aquela que apresentou maior aproveitamento e a aplicação exclusiva de ureia via solo correspondeu ao menor valor de aproveitamento. A volatilização e a imobilização de N no solo podem estar relacionados à baixa recuperação do N do fertilizante, visto que não houve lixiviação por conta do uso de sacos plásticos no interior dos vasos. Alves et al. (2006) obtiveram recuperação de 48% e 46% do N do fertilizante em duas safras de milho, utilizando ureia e sulfato de amônio. As perdas, no entanto, somaram 30%, pois o restante do N foi encontrado na camada 0-20 cm do solo. Os autores também avaliaram a aplicação de fertilizantes nitrogenados em algodão e observaram valores de recuperação do N de 61%; ou seja, o aproveitamento do fertilizante pode variar entre diferentes culturas. Os menores valores de recuperação do N-fertilizante encontrados para a soja (Tabela 4) podem estar relacionados com a obtenção adicional de N pela FBN.

5 CONCLUSÕES

A aplicação de N, tanto em V1 via solo como em R2 via foliar, e a combinação das duas, não eleva a produção de massa de matéria seca de parte aérea, raízes e grãos das plantas e os componentes de produtividade, assim como a concentração e o acúmulo de N e a atividade da enzima nitrato redutase nas folhas. A aplicação de N mineral via solo em V1 reduz a nodulação em V4 e a atividade da nitrogenase nos nódulos em R2.

As folhas e a haste respondem pela maior parcela de participação na remobilização de N para os grãos. Os tratamentos com N via solo mostram tendência de iniciar a remobilização e a senescência das folhas mais cedo que os tratamentos sem N via solo.

O N-FBN é a fonte que mais contribui para o N-total da planta mesmo nos tratamentos com aplicação de fertilizante nitrogenado. Nas vagens e nos grãos a contribuição do N da fixação é ainda maior, próximo a 80% nos tratamentos com N via solo e 96% no tratamento com N foliar.

REFERÊNCIAS

- AFZA, R.; HARDARSON, G.; ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A. Effects of delayed soil and foliar N fertilization on yield and N₂ fixation of soybean. **Plant and Soil**, The Hague, v.97, n.3, p.361-368, 1987.
- ALVES, B. J. R.; BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. The success of BNF in soybean in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.252, p.1-9, 2003.
- ALVES, B.J.R.; ZOTARELLI, L.; FERNANDES, F.M.; HECKLER, J.C.; MACEDO, R.A.T.; BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P.; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de nitrogênio em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 449-456, 2006.
- AOAC International. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Arlington, VA: Association of Analytical Chemists. 1995.
- BARKER, D.W.; SAWYER, J.E. Nitrogen application to soybean at early reproductive development. **Agronomy Journal**, Madison, v.97, p.615-619, 2005.
- BENDER, R.R.; HAEGELE, J.W.; BELOW, F.E. Nutrient uptake, partitioning, and remobilization in modern soybean varieties. **Agronomy Journal**, Madison, v.107, n.2, p.563-573, 2015.
- BERNARD, R.L. Two genes affecting stem termination in soybeans. **Crop Science**, Madison, v.12, n.2, p.235-239, 1972.
- 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 grasses and cereals. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.28, p.889-895, 2001.
- BOHRER, T.R.J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, p.937-952, 1998.
- BOLLARD, E.G. Translocation of organic nitrogen in the xylem. **Australian Journal of Biological Sciences**, East Melbourne, v.10, p.292-301, 1957.
- BONATO, E.R.; BONATO, A.L.V. **A soja no Brasil: história e estatística**. Londrina: EMBRAPA/CNPSo, 1987. 61p. (Documentos, 21)
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrostat – Estatísticas de Comércio Exterior do Agronegócio Brasileiro**. Disponível em: <<http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>> Acesso em: 02 de dez. 2018.
- BULBUL, N.; SAKURAI, M.; MATSUSHIMA, H.; KANEKO, Y. Induction of ultrastructural specialization for ureide metabolism in non-nodule soybean tissues cultured *in vitro*. **Plant Science**, Shannon, v.175, p.833-838, 2008.
- BURRIS, R.H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v.22, p.381-393, 1999.
- CÂMARA, G.M.S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v.147, p.1-9, 2014.

CHUEIRE, L.M.O.; BANGEL, E.V.; MOSTASSO, F.L.; CAMPO, R.J.; PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, n.5, p.833-840, 2003.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, v.5, n.12, 155p. set. 2018.

COSTA, S.I.; MIYA, E.I. Composição química e qualidade organoléptica das principais variedades de soja cultivadas no Brasil. **Divulgando a Pesquisa**, Campinas, v.1, p.1-3, 1972.

DENISON, R.F.; HARTER, B.L. Nitrate effects on nodule oxygen permeability and leghemoglobin: nodule oximetry and computer modeling. **Plant Physiology**, Rockville, v.107, p.1355-1364, 1995.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.36, p.771-774, 1997.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja** – Região Central do Brasil 2014. Londrina: Embrapa Soja, 2013. 65p. (Sistemas de Produção, 6).

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306p.

FAGAN, E.B.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO, NETO D.; MÜLLER L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - Revisão. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, Uruguaiana, v.14, n.1, p.89-106, 2007.

FEHR, W.R.; CAVINESS, E.C. **Stages of soybean development**. Ames: Iowa State University of Science and Technology, 1977. 11p. (Special Report, 80).

FEHR, W.R.; CAVINESS, C.E.; VORST, J.J. Response of indeterminate and determinate soybean cultivars to defoliation and half-plant cut-off. **Agronomy Journal**, Madison, v.17, p.913-917, 1977.

FENILLI, T.A.B.; REICHARDT, K.; TRIVELIN, P.C.O.; FAVARIN, J.L. Volatilization of ammonia derived from fertilizer and its reabsorption by coffee plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.38, p.1741-1751, 2007.

FRANCO, A.A.; DA FONSECA, O.O.M.; MARRIEL, I.E. Efeito do nitrogênio mineral na atividade da nitrogenase e nitrato redutase, durante o ciclo da soja no campo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.2, p.110-114, 1978.

FRIED, M.; MIDDELBOE, V. Measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.47, p.713-715, 1977.

GAN, Y.; STULEN, I.; VAN KEULEN, H.; KUIPER, P.J.C. Effect of N fertilizer top-dressing at various reproductive stages on growth, N₂ fixation and yield of three soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) genotypes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.80, p.147-155, 2003.

- GARNER, W.W.; ALLARD, H.A. Effect of relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. **Journal of Agricultural Research**, v.18, n.11, p.553-606, 1920.
- GEE, G.W.; OR, D. Particle-size analysis. In: DANE, J.H.; TOOP, G.C. (Ed.). **Methods of soil analysis: physical methods**. Madison: Soil Science Society of America, 2002. p.255-293. (Book Series, 5).
- HARPER, J.E.; HAGEMAN, R.H. Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans. **Plant Physiology**, Rockville, v.49, p.146-154, 1972.
- HAWKESFORD, M.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MØLLER, I.S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.). **Mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. Oxford: Academic Press, 2012. p.135-189.
- HERRIDGE, D.F. Relative abundance of ureides and nitrate in plant tissues of soybean as a quantitative assay of nitrogen fixation. **Plant Physiology**, Rockville, v.70, p.1-6, 1982.
- HERRIDGE, D.; BERGERSEN, F.J.; PEOPLES, M.B. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural ¹⁵N abundance methods. **Plant Physiology**, Rockville, v.93, p.708-716, 1990.
- HERRIDGE, D.F.; PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.311, p.1-18, 2008.
- HEYTLER, P.G.; REDDY, G.S.; HARDY, R.W.F. *In vivo* energetics of symbiotic nitrogen fixation in soybeans. In: LUDDEN, P.L.; BERRIS, J.E. (Eds.). **Nitrogen fixation and CO₂ metabolism**. New York: Elsevier, 1985. p.283-292.
- HOWARD, J.B.; REES, D.C. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Chemical Reviews**, Boulder, v.96, n.7, p.2965-2982, 1996.
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja**: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Documentos, 283).
- HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48p. (Circular Técnica, 35/Circular Técnica, 13).
- HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In: WERNER, D; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen fixation in agriculture, forestry ecology and environment**. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2005. p.25-42.
- HUNTER, W.J. Soybean root and nodule nitrate reductase. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v.59, p.471-475, 1983.
- HUTCHINSON, G.L.; MILLINGTON, R.J.; PETERS, D.B. Atmospheric ammonia: absorption by plant leaves. **Science**, Washington, v.175, p.771-772, 1972.
- JAMTGARD S.; NASHOLM, T.; HUSS-DANELL, K. Characteristics of amino acid uptake in barley. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.302, p.221-231, 2008.

JENKINSON, D.S.; FOX, R.H.; RAYNER, J.H. Interactions between fertilizer nitrogen and soil nitrogen — the so-called ‘priming’ effect. **European Journal of Soil Science**, Hoboken, v.36, p.425-444, 1985.

KAMICKER, B.J.; BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, n.3, p.487-492, 1986.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P.A.; GILLER, K.E.; KUYPER, T.W. Differences in photosynthetic behaviour and leaf senescence of soybean (*Glycine max* [L.] Merrill) dependent on N₂ fixation or nitrate supply. **Plant Biology**, Hoboken, v.12, p.60–69, 2010.

KASCHUK, G.; KUYPER, T.W.; LEFFELAAR, P.A.; HUNGRIA, M.; GILLER, K.E. Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.41, p.1233–1244, 2009.

KASCHUK, G.; NOGUEIRA, M.A.; DE LUCA, M.J.; HUNGRIA, M. Response of determinate and indeterminate soybean cultivars to basal and topdressing N fertilization compared to sole inoculation with *Bradyrhizobium*. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.195, p.21-27, 2016.

KHUANKAEW, T.; RUAMRUNGSRI, S.; ITO, S.; SATO, T.; OHTAKE, N.; SUEYOSHI, K.; OHYAMA, T. Assimilation and translocation of nitrogen and carbon in *Curcuma alismatifolia* Gagnep. **Plant Biology**, Hoboken, v.12, p.414-423, 2010.

KICHEY, T.; HIREL, B.; HEUMEZ, E.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J. In winter wheat (*Triticum aestivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilization to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.102, p.22-32, 2007.

KING, C.A.; PURCELL, L.C. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v.137, p.1389-1396, 2005.

KINUGASA, T.; SATO, T.; OIKAWA, S.; HIROSE, T. Demand and supply of N in seed production of soybean (*Glycine max*) at different N fertilization levels after flowering. **Journal of Plant Research**, Tokyo, v.125, p.275–281, 2012.

KUBOTA, A.; HOSHIBA, K.; BORDON, J. Effect of fertilizer-N application and seed coating with rhizobial inoculants on soybean yield in eastern Paraguay. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, n.4, p.1627-1633, 2008.

KUZMA, M.M.; WINTER, H.; STORER, P.; ORESNIK, I.I.; ATKINS, C.A.; LAYZELL, D.B. The site of oxygen limitation in soybean nodules. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p.399-408, 1999.

LAVRES, J.; FRANCO, G.C.; CÂMARA, G.M.S. Soybean seed treatment with nickel improves biological nitrogen fixation and urease activity. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v.4, p.1-11, 2016.

LAZZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H. **Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2010. 46p. (Documentos, 319).

- LEE, Y.H.; FOSTER, J.; CHEN, J.; VOLL, L.M.; WEBER, A.P.M.; TEGEDER, M. AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, Malden, v.50, p.305-319, 2007.
- LI, F.Q.; CHUNG, T.; PENNINGTON, J.G.; FEDERICO, M.L.; KAEPLER, H.F., KAEPLER, S.M.; OTEGUI, M.S.; VIERSTRA, R.D. Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. **Plant Cell**, Rockville, v.27, p.1389–1408, 2015.
- LI, Y.C.; GUPTA, G. Photosynthetic changes in soybean with and without nitrogen and Increased carbon dioxide. **Plant Science**, Shannon, v.89, p.1-4, 1993.
- MAATHUIS, F.J. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.12, n.3, p.250-258, 2009.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1980. 251p.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997, 319p.
- MARTIN, C.; THIMANN, K.V. The role of protein synthesis in the senescence of leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.49, p.64-71, 1972.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, Oxford, v.105, n.7, p.1141-1157, 2010.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M.; ORSEL, M. Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. **Plant Biology**, Hoboken, v.10, p.23–36, 2008. Suppl. 1.
- MASTRODOMENICO, A.T.; PURCELL, L.C. Soybean nitrogen fixation and nitrogen remobilization during reproductive development. **Crop Science**, Madison, v.52, p.1281–1289, 2012.
- McCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.64, n.3, p.411-416, 1979.
- MEHMET, O.Z. Nitrogen rate and plant population effects on yield and yield components in soybean. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v.7, p.4464-4470, 2008.
- MENDES, I.C.; HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Soybean response to starter nitrogen and *Bradyrhizobium* inoculation on a Cerrado Oxisol under no-tillage and conventional tillage systems. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, p.81-87, 2003.
- MENDES, I.C.; REIS JUNIOR, F.B.; HUNGRIA, M.; SOUSA, D.M.G.; CAMPO, R.J. Adubação nitrogenada suplementar tardia em soja cultivada em latossolos do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.43, n.8, p.1053-1060, 2008.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 5. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. 849p.

MERCANTE, F.M.; HUNGRIA, M.; MENDES, I.C.; REIS JÚNIOR, F.B. **Estratégias para aumentar a eficiência de inoculantes microbianos na cultura da soja**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2011. 4p. (Comunicado Técnico, 169).

MEYER, C.; STITT, M. Nitrate reduction and signaling. In: LEA, P.J.; MOROT-GAUDRY, J.F. (Eds.). **Plant nitrogen**. Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. p.37-59.

MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; HADLEY, P.; ROBERTS, E.H.; RAWSTHORNE, S. Carbon and nitrogen of nodulated roots of grain legumes. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.4, p.5-26, 1981.

MORSE, W.J. History of soybean production. In: MARKLEY, K. S. **Soybeans and soybean products**. New York: Interscience, 1950. p.3-59.

MULDER, E.G.; BOXMA, R.; VAN VENN, W.L. The effect of molybdenum and nitrogen deficiencies on nitrate reduction in plant tissue. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.10, p.335-355, 1959.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, Rockville, v.7, p.869-885, 1995.

OSBORNE, S.L.; RIEDELL, W.E. Starter nitrogen fertilizer impact on soybean yield and quality in the Northern Great Plains. **Agronomy Journal**, Madison, v.98, p.1569-1574, 2006.

PARRY, M.A.J.; ANDRALOIC, P.J.; MITCHELL, R.C.; MADGWICK, P.J.; KEYS, A.J. Manipulation of Rubisco: the amount, activity, function and regulation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, p.1321-1333, 2003.

PATE, J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.5, p.109-119, 1973.

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

PEOPLES, M.B.; CRASWELL, E.T. Biological nitrogen fixation; investments, expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.141, n.1, p.13-39, 1992.

PEREIRA, S.R. A evolução do complexo soja e a questão da transgenia. **Revista de Política Agrícola**, Brasília, v.13, n.2, p.26-32, 2004.

PERINI, L.J.; FONSECA JÚNIOR, N. da S.; DESTRO, D.; PRETE, C.E.C. Componentes da produção em cultivares de soja com crescimento determinado e indeterminado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, p.2531-2544, 2012.

PIEROZAN, C.; FAVARIN, J.L.; ALMEIDA, R.E.M.; OLIVEIRA, S.M.; LAGO, B.C.; TRIVELIN, P.C.O. Uptake and allocation of nitrogen applied at low rates to soybean leaves. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.39, p.83-94, 2015.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2016. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>.

- RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; GUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. 1. ed. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285p.
- RAY, J.D.; HEATHERLY, L.G.; FRITSCHI, F.B. Influence of large amounts of nitrogen applied at planting on non-irrigated and irrigated soybean. **Crop Science**, Madison, v.46, n.2, p.52-60, 2006.
- REIS, A.R.; FAVARIN, J.L.; MALAVOLTA, E.; LAVRES JUNIOR, J.; MORAES, M.F. Photosynthesis, Chlorophylls, and SPAD readings in coffee leaves in relation to nitrogen supply. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v.40, p.1512-1528, 2009.
- RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; THOMPSON, H.E.; BENSON, G.O. **How a soybean plant develops**. Ames, Iowa State University of Science and Technology: Cooperative Extension Service, 1994. 20p. (Special Report, 53).
- ROBERTS, I.N.; CAPUTO, C.; CRIADO, M.V.; FUNK, C. Senescence-associated proteases in plants. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v.145, p.130-139, 2012.
- SA, T.M., ISRAEL, D.W. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, n.4, p.928-935, 1991.
- SALON, C.; MUNIER-JOLAIN, N.; DUC, G.; VOISIN, A.S.; GRANDGIRARD, D.; LARMURE, A.; EMERY, R.J.N.; NEY, B. Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. **Agronomie**, Les Ulis, v.21, p.539-552, 2001.
- SALVAGIOTTI, F.; CASSMAN, K.G.; SPECHT, J.E.; WALTERS D.T.; WEISS, A.; DOBERMANN, A. Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.108, p.1-13, 2008.
- SANTOS, E.F.; SANTINI, J.M.K.; PAIXAO, A.P.; FURLANI JUNIOR, E.; LAVRES, J.; CAMPOS, M.; REIS, A.R. Physiological highlights of manganese toxicity symptoms in soybean plants: Mn toxicity responses. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.113, p.6-19, 2017.
- SATURNO, D.F.; CEREZINI, P.; SILVA, P.M.; OLIVEIRA, A.B.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A. Mineral nitrogen impairs the biological nitrogen fixation in soybean of determinate and indeterminate growth types. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v.40, n.12, p.1690-1701, 2017.
- SAWAZAKI, H.E.; SODEK, L.; TEIXEIRA, J.P.F. Transporte de compostos nitrogenados em soja cultivada com diferentes fontes de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v.46, n.2, p.291-302, 1987.
- SCHLESINGER, W.H. **Biogeochemistry: an analysis of global change**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 588p.
- SHEARER, G.; KOHL, D.H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v.13, p.699-756, 1986.

SHIBLES, R.M. Soybean nitrogen acquisition and utilization. In: North Central Extension-Industry Soil Fertility Conference, 28., 1998, St. Louis. **Proceedings...** Brookings: Potash & Phosphate Institute, 1998. p.5-11.

SILSBURY, J.H. Energy requirement for symbiotic nitrogen fixation. **Nature**, London, v.267, p.149-150, 1977.

SILVA, A.F.; FREITAS, A.D.S.; STAMFORD, N.P. Efeito da inoculação da soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.5, p.1327-1333, 2002.

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

STEPHENS, B D.; NEYRA, C.A. Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiology**, Rockville, v.71, n.4, p.731-735, 1983.

SVENNERSTAM, H.; GANETED, U; NASHOLM, T. Root uptake of cationic amino acids by *Arabidopsis* depends on functional expression of amino acid permease. **New Phytologist**, Hoboken, v.180, p.620–630, 2008.

SVENNERSTAM, H.; GANETEG, U.; BELLINI, C.; NASHOLM, T. Comprehensive screening of *Arabidopsis* mutants suggests the lysine histidine transporter 1 to be involved in plant uptake of amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v.143, n.4, p.1853–60, 2007.

TAHIR, M.M.; ABBASI, M.K.; RAHIM, M.; KHALIQ, A.; KAZMI, M.H. Effect of *Rhizobium* inoculation and NP fertilization on growth, yield and nodulation of soybean (*Glycine max* L.) in the sub-humid hilly region of Rawalakot Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v.8, p.6191-6200, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 693 p.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. Phenology, growth, and yield of field-grown soybean and bush bean as a function of varying modes of N nutrition soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.575-583, 1995.

TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v.23, n.10, p.1005-1024, 2000.

USDA. **Soybeans:** World supply and distribution. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 19 de jan. 2019.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R.P.; DE MORAIS, R.F.; BATISTA, R.B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J.M.; MAIA E SÁ, J.; BARBOSA, K.P.; DE RESENDE, A.S.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.M.; 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**, Dordrecht, v.356, p.5-21, 2012.

VADEZ, V.; SINCLAIR, T.R.; SERRAJ, R.; PURCELL, L.C. Manganese application alleviates the water deficit-induced decline of N₂ fixation. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v.23, p.497–505, 2000.

WADA, S.; ISHIDA, H.; IZUMI, M.; YOSHIMOTO, K.; OHSUMI, Y.; MAE, T.; MAKINO, A. Autophagy plays a role in chloroplast degradation during senescence in individually darkened leaves. **Plant Physiology**, Rockville v.149, p.885–893, 2009.

WATANABE, I.; TABUCHI, K.; NAKANO, H. Response of soybean to supplemented nitrogen after flowering. In: SHANMUGASUNDARAM, S.; SULZBERGER, E.W.; MCLEAN, B.T. (Ed.). **Soybean in Tropical and Subtropical Cropping System**. Taiwan: AVRDC, 1986. p.301-308.

YAMADA, T. Melhoria na eficiência da adubação aproveitando as interações entre os nutrientes. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n.100, p.1-5, 2002.

YOUNG, E.G.; CONWAY, C.F. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v.142, n.4, p.839-853, 1942.

ZHANG, F.; DASHTI, N.; HYNES, R.K.; SMITH, D.L. Plant growth-promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. **Annals of Botany**, Oxford, v.77, n.5, p.453-460, 1996.