

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

GUILHERME DE CASTRO FRANCO

**Tratamento de sementes de soja com níquel para o aumento da
fixação biológica e atividade da urease**

Piracicaba

2015

GUILHERME DE CASTRO FRANCO

**Tratamento de sementes de soja com níquel para o aumento da
fixação biológica e atividade da urease**

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: Química na
Agricultura e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. José Lavres Junior

Piracicaba

2015

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Franco, Guilherme de Castro

Tratamento de sementes de soja com níquel para o aumento da fixação biológica e atividade da urease / Guilherme de Castro Franco; orientador José Lavres Junior. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

62 p. : il.

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

1. Fixação de nitrogênio 2. Isótopos estáveis 3. Micronutrientes
4. Nitrogenase 5. Nitrogênio I. Título

CDU 631.81.095.337 : 631.811

*Aos meus pais,
Marcus Tadeu Valério Franco e Valéria Maria de Castro Franco,
pela oportunidade da vida, por todo amor e pelo simples fato de existirem.
À minha irmã,
Isabela de Castro Franco, pelo senso de justiça, idealismo e amizade desde sempre.*

DEDICO

*As minhas avós,
Idê Lemes Valério Franco (In Memoriam) e Maria Anunciação de Castro,
Pela sabedoria, apoio, ensinamentos e exemplo de vida.*

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela dádiva da vida.

A Nossa Senhora Aparecida pela proteção e por iluminar meus passos.

Ao professor e orientador Dr. José Lavres Junior, pela confiança, pelos ensinamentos, dedicação, disponibilidade de tempo, orientação e profissionalismo.

Ao amigo José Marcos Leite pela imensurável ajuda, pelos conselhos e amizade em todos os momentos ao longo do mestrado.

À Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP e ao programa de Pós-Graduação do respectivo centro pela estrutura e apoio na realização do curso.

Aos professores do CENA/USP e ESALQ/USP pelos ensinamentos transmitidos durante o curso.

Aos funcionários do CENA/USP em especial à Cleusa Pereira Cabral por toda ajuda e prontidão no auxílio no cronograma das avaliações e na realização das análises enzimáticas.

Ao Professor Dr. Angelo Pedro Jacomino, ao técnico Marcos José Trevisan e ao colega Raphael Florencio Garrone pelo auxílio nas análises referentes à enzima nitrogenase.

Ao Professor Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, pelas discussões, empréstimos de materiais de estudo e ensinamentos sobre técnicas isotópicas e ao técnico Hugo Batagello por realizar as análises por IRMS no LIE-CENA.

Ao Professor Dr. Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni pela autorização do uso do Laboratório de análises químicas do Departamento de Ciência do solo da ESALQ/USP e a Sra. Marina Colzato pelo auxílio nas análises de Ni em sementes de soja.

Ao João Paulo Francisco, doutorando do programa de Pós-Graduação em Engenharia de Sistemas Agrícolas da ESALQ/USP, pelo auxílio na montagem, acompanhamento e cálculos da necessidade diária de água para as plantas.

À Carina Nascimento, pela disponibilidade e ajuda sempre que necessário.

À minha namorada, Roberta Helena Miranda Coutinho, por todo apoio, incentivo, carinho e por ser tão especial para mim.

Aos amigos: Juliano Toledo Saib Marcelino, Guilherme de Souza Hipólito, José Marcos Leite, Rafael Butke, Willian Pereira, Aijânio Gomes Brito Silva, Jhonny Rodrigo, Evandro Schonell, Robson Mauri, Carina Nascimento, Ingrid Kely Santana, Silvia Paiva e todos os amigos de Lambari- MG, pela amizade, apoio e convivência.

Aos colegas de Pós-Graduação do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA, pela troca de experiência, discussões e ajuda sempre que necessário.

À Produquímica S/A, na pessoa do Sr. Ithamar Prada Neto, Diretor de Pesquisa e Desenvolvimento, pelo incentivo e por disponibilizar tempo para que eu realizasse o curso.

À sementes Brejeiro, por ter me fornecido as sementes para o experimento.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ, pela sólida formação cidadã e acadêmica.

Ao pesquisador da Embrapa Solos, Dr. José Carlos Polidoro pela amizade e pelos valiosos ensinamentos desde minha graduação.

A todas aquelas pessoas que de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste projeto.

MUITO OBRIGADO!!!

“Se podemos sonhar, também podemos tornar nossos sonhos realidade”.

Walt Disney

RESUMO

FRANCO, G. C. **Tratamento de sementes de soja com níquel para o aumento da fixação biológica e atividade da urease.** 2015. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

O Níquel (Ni) é um micronutriente para as plantas, por ser componente estrutural das enzimas urease e hidrogenase, que desempenham função no metabolismo do nitrogênio (N) nas plantas leguminosas. A aplicação de Ni via tratamento de semente em soja pode potencializar o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) com a finalidade de proporcionar maior produção de biomassa da parte aérea e de grãos. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da aplicação de doses de Ni, via tratamento de semente, no processo de FBN em plantas de soja, por meio da atividade de nitrogenase (AN_{ase}) e da abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}N_{\text{‰}}$). Foi realizado um experimento em casa de vegetação, em condições controladas. O genótipo de soja BMX POTÊNCIA RR foi cultivado em solo arenoso e submetido à aplicação de 0; 45; 90; 135; 180; 360; e 540 mg kg⁻¹ de Ni aplicado via tratamento de semente. As plantas de soja foram conduzidas até o estágio fenológico R7 (maturação dos grãos). Foram avaliadas a concentração de macro e micronutrientes nas folhas utilizadas para diagnose, determinou-se o teor de clorofila, a atividade enzimática da urease, bem como se quantificou a massa seca de nódulos, no estágio fenológico R1 (Início da floração: até 50% das plantas com flor). Foram ainda determinados: as produções de massa seca de parte aérea e de grãos, o índice de colheita, os acúmulos de Ni e de N na semente e a contribuição da fixação biológica de nitrogênio, por meio da técnica de abundância natural de ^{15}N e indiretamente através da técnica da redução do acetileno (atividade da nitrogenase). Observou-se que as doses de Ni exerceram efeitos em todos os parâmetros avaliados. A aplicação de Ni na dose de 45 mg kg⁻¹ aumentou a fixação biológica de N na ordem de 12% em relação ao tratamento controle (sem adição de Ni) e incrementou o acúmulo de Ni e de N no grão, com efeito na atividade da enzima urease. A aplicação de 45 e 90 mg kg⁻¹ de níquel via semente resultou, respectivamente, no aumento de 67% e 77% da atividade da NA_{ase} em relação ao controle. Pela análise da abundância natural de ^{15}N no grão ($\delta^{15}N_{\text{‰}}$) observou-se que houve diferença na FBN entre os tratamentos e que a aplicação da dose de 45 mg kg⁻¹, de Ni via semente, revelou que 99% do N acumulado no grão foi proveniente da FBN, enquanto que no tratamento sem adição de Ni via semente, a contribuição da FBN foi de apenas 77%. Nas condições do experimento, a aplicação de Ni na semente refletiu em maior produção de massa seca de parte aérea e na produção de grãos de soja.

Palavras-chave: Nitrogênio. *Glycine max*. Fixação simbiótica de N. Nitrogenase. Abundância natural de ^{15}N .

ABSTRACT

FRANCO, G. C. **Nickel soybean seed treatment for improving biological nitrogen fixation and urease activity**. 2015. 62 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Nickel (Ni) is an essential micronutrient for plants due to its role on structural component of the enzymes urease and hydrogenase, which perform nitrogen (N) metabolism in legumes plants. Seed treatment with Ni in soybean might improve the symbiotic or biological nitrogen fixation (BNF) process, by increasing biomass production and grain yield. The objective of this study was to evaluate the effect of soybean seed treatment with Ni rates on the biological nitrogen fixation (BNF) process by evaluating the nitrogenase activity (NA_{ase}), the natural ^{15}N abundance ($\delta^{15}N$ ‰) and urease activity in soybean plants, as well. The experiment was carried out in greenhouse with controlled conditions. The soybean cultivar used was BMX POTÊNCIA RR, which was grown in sandy soil, and submitted to application of 0, 45, 90, 135, 180, 360 and 540 $mg\ kg^{-1}$ of Ni on the seed treatment. Soybean plants were grown up to the R7 developmental stage (grain maturity). Macro and micronutrients concentration in the leaves used for diagnosis, as well as the chlorophyll content and urease activity have been determined on these tissues, and dry weight of nodules were evaluated in developmental stage R1 (flowering stage). The following measurements also were made: dry matter yield of plant top, dry matter yield of grains, the harvest index, uptake of Ni and N in the seed and the contribution of biological nitrogen fixation by ^{15}N natural abundance and to indirectly way by the reduction of acetylene technique (nitrogenase activity), as well. It was observed that Ni rates influenced all parameters. Application of Ni rate of 45 $mg\ kg^{-1}$ increased biological nitrogen fixation in the order of 12% as compared to the control. Ni rates of 45 and 90 $mg\ kg^{-1}$ via seed treatment increased the NA_{ase} activity, respectively, in 67% and 77% compared to the control. Other benefits of Ni-soybean seeds treatment were the increased accumulation of Ni and N on the grain and its positive influence on the urease activity. By analyzing the natural abundance of ^{15}N on the grain ($\delta^{15}N$ ‰) it was observed that there were differences between treatments in the symbiotic nitrogen fixation. Around 99% of total N taken up in the seeds came from biological nitrogen fixation by supplying Ni-seed application rate of 45 $mg\ kg^{-1}$, whereas in the control, the contribution of BNF was only 77%. In these experimental conditions, seed treatment with Ni reflected in higher dry matter production of plant top and grain yield.

Keywords: Nitrogen. *Glycine max*. Symbiotic nitrogen fixation. Nitrogenase. ^{15}N natural abundance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Cultivo da soja no Brasil	19
2.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em soja	20
2.3 Importância da adubação com micronutrientes na FBN.....	21
2.4 Níquel na planta: deficiência e toxidez	22
2.5 Papel do Ni no metabolismo do N	24
2.6 Aplicação do Ni via semente	25
2.7 Técnicas para quantificar a FBN	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Coleta do solo e área experimental.....	27
3.2 Delineamento experimental.....	30
3.2 Avaliações	30
3.2.1 Coleta de folha e determinação das concentrações de nutrientes	30
3.2.2 Determinação do índice SPAD.....	31
3.2.3 Determinação de N-total e quantificação da FBN (abundância natural de ¹⁵ N).....	31
3.2.4 Determinação da atividade da enzima urease	33
3.2.5 Determinação da atividade da enzima nitrogenase.....	33
3.2.6 Massa seca de parte aérea e produção de grãos	35
3.2.7 Determinação das concentrações e acúmulo de Ni no grão da soja.....	35
3.3 Análise dos dados	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 Concentrações foliares de nutrientes	36
4.2 Índice SPAD, acúmulo de N, ¹⁵ N e FBN.....	40
4.4 Concentração e acúmulo de Ni na semente.....	49
4.5 Produção de massa seca da parte aérea , produção de grãos, índice de colheita e massa seca de nódulos.....	51
5-CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de soja, cultura que se destaca como uma das principais oleaginosas cultivadas. É importante também como fonte de proteína para alimentação animal e humana, e nos últimos anos também tem sido utilizada como fonte para fabricação de biocombustíveis. Nos últimos 30 anos, a produção e a produtividade média estão crescendo e este aumento se deve a uma série de fatores, como: desenvolvimento e aplicação de tecnologias principalmente nas áreas de melhoramento genético, fertilidade do solo, nutrição de plantas, agricultura de precisão, manejo fitotécnico e aplicação de fungicidas (CÂMARA, 2014).

Nos últimos 50 anos a expansão do cultivo em solos na região do Cerrado é inegável, sendo que este crescimento foi possível devido à correção dos solos com calcário e gesso agrícola. A introdução do plantio direto sobre a palha foi também uma contribuição significativa para o cultivo destas plantas, com diversos aspectos positivos dentre eles os benefícios nas fertilidades física, química e biológica dos solos (LOPES; GUILHERME, 2007; LOPES et al., 2014).

Acompanhando o aumento de produtividade, a pesquisa brasileira descobriu e selecionou diversas estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium* com capacidade para fixação biológica do nitrogênio (N) do ar (FBN). Porém, recentemente têm surgido algumas dúvidas quanto à capacidade da FBN em suprir sistemas com altas produtividades agrícolas. Mas este argumento é ainda duvidoso, pois necessita de experimentos bem conduzidos e com longo período de duração. Sabe-se que o processo de FBN é resultado de uma simbiose entre planta e bactéria e envolve reações complexas, sendo limitados por diversos fatores, dentre eles a aplicação de micronutrientes no tratamento de semente (CÂMARA, 2014).

O Níquel (Ni) é um micronutriente cuja essencialidade já foi comprovada desde 1975 (DIXON et al. 1975), mas no Brasil são poucos os estudos sobre este elemento, principalmente na cultura da soja. Sabe-se que o Ni é constituinte da urease (enzima responsável pela hidrólise da ureia), além disso, ele também é necessário para bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* que contêm hidrogenases, para as quais é essencial o adequado suprimento de Ni, de tal modo que sua deficiência pode afetar a fixação de N₂ atmosférico. Esta enzima é capaz de reprocessar parte do gás de H₂ gerado durante o processo de fixação do nitrogênio

atmosférico, podendo com isso, recuperar parte da energia gasta para romper as triplas ligações que garantem a estabilidade da molécula de N₂ (CÂMARA, 2014; REIS et al., 2014).

Cerca de 15 a 20% do carbono fixado pode ser gasto no processo de FBN para manter a simbiose entre a bactéria e a planta de soja. Em uma relação de troca, a planta fornece fotoassimilados (energia) e a bactéria gera compostos ricos em N (amidas e ureídeos) (NEVES; HUNGRIA, 1987; KASCHUK et al., 2009; KASCHUK et al., 2012). O consumo de carbono para fixação do N₂ atmosférico é variável e é influenciado por diversos fatores, dentre eles a presença da enzima hidrogenase que pode reduzir o custo energético da ordem de 11% a 25%, resultando em economia de carbono (NEVES; HUNGRIA, 1987; KASCHUK et al., 2010; LUCA et al., 2014). Embora a evolução do H₂ tenha sido frequentemente indicada como um dos fatores que limitam a eficiência da fixação do N₂ resta dúvidas sobre a eficiência deste processo (NEVES; HUNGRIA, 1987; EVANS et al., 1987).

Sabe-se que o Ni é constituinte da enzima hidrogenase, logo, a presença deste elemento será essencial para a atividade desta enzima em manter todo o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) altamente eficiente (EVANS et al., 1987). A hipótese deste trabalho é que, o fornecimento de Ni no tratamento de semente em soja pode promover o desenvolvimento da cultura, por aumentar a eficiência da FBN, na atividade da enzima urease, no acúmulo de N-total na planta e, conseqüentemente, otimizando o metabolismo do N nas plantas de soja, refletindo em maior produção de matéria seca da parte aérea e de grãos de soja.

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da aplicação de doses de Ni, via tratamento de semente, no processo de fixação biológica de N (atividade da nitrogenase e avaliação da abundância natural de ¹⁵N - δ¹⁵N‰), no acúmulo de massa seca e de N na planta, bem como avaliar o teor de clorofila (em unidades SPAD), a atividade da urease e determinar a concentração e o conteúdo de Ni nas plantas de soja, cultivar BMX POTÊNCIA RR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultivo da soja no Brasil

A safra brasileira de grãos em 2012/2013 alcançou a produção de 195,4 milhões de toneladas em 56,3 milhões de hectares cultivados. A área plantada de soja chegou a 30,1 milhões de hectares com uma produção de 86,2 milhões de toneladas e produtividade média de 2.940 kg ha⁻¹ (CONAB, 2014). No Brasil a soja é a cultura com maior área cultivada e atualmente encontra-se em expansão nas regiões Norte, Centro Oeste e Nordeste.

O crescimento da cultura da soja no país esteve sempre associado aos avanços científicos e a disponibilização de tecnologias ao setor produtivo. A mecanização e a utilização de cultivares altamente produtivos adaptados às diversas regiões, o desenvolvimento de pacotes tecnológicos relacionados ao manejo de solos, como de semeadura direta, ao manejo de adubação e calagem, manejo de pragas e doenças, controle de ervas daninhas entre outros, são responsáveis por este crescimento (LOPES; GUILHERME, 2007; CÂMARA, 2014; LOPES et al., 2014).

Sem dúvida, uma das principais técnicas que propiciou o aumento da área cultivada de soja foi a adoção do sistema de plantio direto (SPD), ou sistema de plantio direto na palha (SPDP). Esta técnica é uma forma de manejo conservacionista, pois passou de uma simples opção de controlar a erosão para um sistema ordenado de práticas agrícolas interligadas e altamente dependentes entre si (ANGHINONI, 2007). Isso é justificado pelo fato de que esse complexo de tecnologias demanda menor força de trabalho e de energia fóssil, estimula os processos de flocculação e agregação do solo e reduz a velocidade de mineralização da matéria orgânica (ANGHINONI, 2007). O sistema SPD pode ainda reduzir a erosão e favorecer o controle biológico de pragas, de doenças e de plantas daninhas, prevenindo o uso de defensivos (ANGHINONI, 2007).

Paralelo à implantação do SPD no Brasil, ocorreu a expansão para os solos ácidos do Cerrado. O aumento do cultivo nestas áreas requer um conjunto de técnicas, tais como: correção do solo com calcário, aumentos dos níveis de nutrientes com adubação corretiva de macro e micronutrientes e rotação de culturas (LOPES et al., 2014). Antes da implantação do SPD, uma prática necessária é a

correção do solo com incorporação do calcário, sendo que a calagem proporciona a neutralização de níveis tóxicos de Al^{3+} solúvel, aumento de bases trocáveis, aumento da disponibilidade de nutrientes e conseqüentemente aumento da fertilidade do solo (LOPES et al., 2014; CAIRES et al., 2011).

2.2 Fixação biológica de nitrogênio (FBN) em soja

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual a maior parte do N atmosférico é incorporado à matéria viva, ao longo da evolução do nosso planeta. Ainda hoje, este processo constitui a principal via de incorporação de N ao ecossistema, que constantemente é reciclado para a atmosfera principalmente pela ação de organismos decompositores de matéria orgânica do solo (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; LUCA et al., 2014). Dessa forma, a ação de microorganismos fixadores de N e de nitrificadores garante um reservatório inesgotável de N na atmosfera (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003).

Embora uma série de sistemas de fixação de N já tenha sido descrita, a FBN é restrita aos organismos procariotos. Destes procariotos, muitos são heterótrofos, necessitando de um suplemento de carbono reduzido. Desta forma, podemos caracterizar três grupos de bactérias fixadoras de N: diazotrofos de vida livre, diazotrofos associativos e os diazotrofos simbióticos, que em alguns casos estabelecem uma interação estreita entre macro e microssimbionte e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos (REIS et al., 2006).

Na cultura da soja, a maior parte do N é suprida por meio da FBN, processo simbiótico, no qual as bactérias *Bradyrhizobium* infectam as raízes, via pelos radiculares e formam nódulos, nos quais o N_2 é convertido em NH_3 (REIS et al., 2006; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010). O N é o nutriente exigido em maior quantidade pela cultura da soja, sendo que os teores nos grãos variam de 45 a 65 g kg^{-1} . Para atingir uma produtividade média de 3000 $kg\ ha^{-1}$ são demandados em média 240 $kg\ ha^{-1}$ de N (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010). Portanto, a FBN torna-se fundamental para o fornecimento da grande demanda de N e apresenta um enorme impacto positivo para o Brasil, devido a economia de fertilizantes nitrogenados.

2.3 Importância da adubação com micronutrientes na FBN

No processo de FBN está presente a principal enzima chave que se chama nitrogenase, ela é um complexo enzimático redox-ativo que hidrolisa ATP para realizar a redução do N_2 a NH_3 . É formada por duas subunidades, um heterotetrâmero, a dinitrogenase $\alpha_2\beta_2$, e um homodímero, a dinitrogenase redutase γ_2 . A subunidade α contém um sítio ativo para a redução do nitrogênio, composto de molibdênio (Mo), ferro (Fe) e enxofre (S) – $MoFe_7S_9$ chamado de FeMo-cofator (REIS et al., 2006). Leguminosas que são dependentes de fixação de N_2 têm uma exigência elevada de Mo, particularmente em nódulos das raízes. A deficiência de Mo afeta o desenvolvimento de nódulos, reduzindo a multiplicação do bacteróide (BARRON et al., 2009).

No processo de simbiose bactéria-planta, na fixação do *Rhizobium*, o cobalto (Co) faz parte da constituição da vitamina B_{12} (cobamida) necessário para a biossíntese da leghemoglobina (MALAVOLTA et al., 1997; MALAVOLTA, 2006). Algumas pesquisas têm relatado que a deficiência aguda de Co reduz a infecção do bacteróide, retarda a formação, a taxa de crescimento do nódulo, o conteúdo bacteróide de nódulos (COOPER; SCHERER, 2012). O Boro (B) é um micronutriente envolvido na formação do nódulo. O B além de cumprir diversas funções na planta, a sua demanda em espécies leguminosas é relativamente elevada para o desenvolvimento de nódulos, sendo cerca de quatro a cinco vezes maior do que nas raízes da soja (CARPENA et al., 2000). A deficiência de B no processo de formação das raízes e na simbiose bactéria e leguminosa leva à diminuição do tamanho e dos números de nódulos (COOPER; SCHERER, 2012).

Outro micronutriente importante no processo de FBN é o Ni. Conforme demonstrado por Evans et al., (1987), o Ni tem efeito estimulante na nitrificação e mineralização de compostos contendo N-orgânico e bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* que contêm a enzima hidrogenase. Esta enzima é capaz de reprocessar parte do gás de H_2 gerado durante o processo de fixação do nitrogênio atmosférico, podendo com isso, recuperar parte da energia gasta para romper as triplas ligações que garantem estabilidade das moléculas de nitrogênio (KLUCAS et al., 1983; URETA et al., 2005). O Ni é constituinte desta enzima hidrogenase que tem a função de executar o reprocessamento do H_2 no interior do nódulo, pois no

processo de redução do H^+ em H_2 pode haver competição pelos elétrons da nitrogenase (EVANS et al., 1987). O Ni é essencial para a formação e para a expressão da hidrogenase (KLUCAS et al., 1983). Estes mesmos autores observaram que a atividade da hidrogenase foi reduzida ou não detectada em células incubadas na ausência de Ni. Verificaram ainda que ao aplicar Ni em plantas deficientes, promoveu o ressurgimento da atividade da hidrogenase e este elemento foi necessário na síntese proteica e na expressão desta enzima. Estudos indicam que o nível da atividade da hidrogenase pode ser limitado em solos agrícolas devido a baixa disponibilidade de Ni nos solos ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$), em extrator DTPA. Valores reduzidos disponíveis em solos afetaram o processamento da subunidade da enzima hidrogenase, mas esta situação foi revertida pela adição de Ni na dose de 10 mg dm^{-3} (URETA et al., 2005).

Grande quantidade de H_2 é liberado dos nódulos durante o processo de fixação do N, a produção deste hidrogênio tem sido descrito como um dos principais fatores que afetam a eficiência da FBN (ALBRECHT et al., 1979). A hidrogenase permite o *Rizobium* reaproveitar o hidrogênio gerado no processo de FBN. Este reaproveitamento reduz as perdas de energia associadas com a FBN e otimiza a eficiência do gasto energético no processo simbiótico (BAGINSKY et al., 2002).

2.4 Níquel na planta: deficiência e toxidez

Os elementos com funções específicas, ou seja, essenciais no metabolismo das plantas são geralmente classificados em dois grupos, bem como em relação às suas concentrações na planta: os macronutrientes e os micronutrientes (MENGEL; KIRKBY, 2001; EPSTEIN; BLOOM, 2005). Dentre os elementos que as plantas necessitam para crescer e se desenvolver está o micronutriente Ni. Deste modo, vários metais pesados são micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Ni e Zn) podendo, sua deficiência, limitar a produção agrícola. Cita-se, por exemplo, o caso do Zn no Brasil. Por outro lado, devido a falta de conhecimento, elementos essenciais como Ni é visto apenas como um metal pesado tóxico, ainda que sua essencialidade já tenha sido comprovada direta e indiretamente há praticamente mais de três décadas (MALAVOLTA et al., 2006). Um elemento é considerado essencial quando satisfaz

os critérios direto e indireto de essencialidade, ou um dos dois (ARNON; STOUT, 1939; MALAVOLTA et al., 2006).

O Ni satisfaz o critério indireto de essencialidade proposto por Arnon e Stout (1939), e também o critério direto de essencialidade. O Ni foi o último elemento considerado como elemento essencial para a vida das plantas. Sua essencialidade se deve a sua participação na metaloenzima urease, enzima que catalisa a degradação da ureia em dióxido de carbono e amônia (DIXON et al., 1975), o que torna esse elemento extremamente importante para o metabolismo do N nas plantas. Segundo Wood e Reilly (2007), a comprovação da essencialidade do Ni somente ganhou aspecto prático após a constatação, e posterior correção, da anomalia conhecida como *mouse-ear* (orelha de rato), resultado da deficiência severa de níquel em pomares de pecã nos Estados Unidos (WOOD; REILLY; NYCZEPIR, 2004a; 2004b). Recentes livros abordando a nutrição mineral de plantas tratam o níquel como micronutriente (EPSTEIN; BLOOM, 2005; MALAVOLTA, 2006). Kutman, Kutman e Cakmak (2013), estudando o aumento da concentração de Ni em sementes de soja, observaram efeitos positivos do micronutriente no metabolismo de aminoácidos, bem como redução do efeito negativo da aplicação excessiva de uréia via folha, relatando o alto potencial da aplicação foliar do Ni para melhorar a utilização de fertilizantes nitrogenados na soja e, possivelmente, em outras culturas. A deficiência de Ni inibe a atividade da urease promovendo acúmulo de ureia nas folhas, ocasionando o aparecimento de manchas necróticas, bem como impedindo o desenvolvimento da cultura e em casos mais severos provocando até a morte das plantas (DECHEN; NACHTIGAL, 2007). Segundo Brown et al. (1987), a deficiência de Ni é caracterizada por uma vasta gama de efeitos no crescimento das plantas e no metabolismo, como a redução no crescimento das plantas, a senescência foliar precoce, redução no metabolismo do N (assimilação do N) e a absorção de ferro. Alguns estudos também indicam que o Ni pode exercer papel significativo na síntese de fitoalexinas e na resistência da planta a doenças.

A essencialidade do Ni foi demonstrada por Dixon et al. (1975); por Polacco (1976; 1977); por Eskew et al. (1983; 1984); por Brown et al. (1987), critério direto, e por Shimada e Ando (1980) e Shimada et al. (1980), critério indireto. O Ni está envolvido na atividade da urease (EC 3.5.1.5 - enzima que hidrolisa a ureia em NH_3 e CO_2), importante para a assimilação do N via ciclo da ureia, principalmente em plantas em que a assimilação do N ocorre via urédeos, como aquelas que

apresentam associação com bactérias fixadoras de N_2 (BAI et al., 2006). Apesar do crescente uso de micronutrientes na agricultura, existem poucos estudos sobre a exigência de Ni para as culturas. Até mesmo por ser um nutriente relativamente novo para a nutrição mineral de plantas. Ademais, deve considerar que, respostas ao Ni não foram observadas no Brasil, talvez porque ainda seja erradamente considerado como elemento tóxico, e por isso não tenha sido objeto de experiência local (MALAVOLTA et al., 2006).

A grande maioria dos estudos envolvendo o Ni tem sido voltada para conhecimento dos efeitos de toxidez, visto que, até então era considerado apenas como metal pesado tendo como objetivo investigar os efeitos tóxicos do excesso deste micronutriente no solo em determinadas situações. Por outro lado, os estudos acerca dos seus efeitos na nutrição de plantas são efetuados basicamente em solução nutritiva, e poucos estudos são realizados com o fornecimento do nutriente via solo, semente ou folha (MALAVOLTA et al., 2006; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013).

2.5 Papel do Ni no metabolismo do N

O Ni está diretamente relacionado ao metabolismo de N nas plantas, por ser constituinte da enzima urease, conforme relatado anteriormente. Como a demanda de N pelas plantas é altamente dependente da hidrólise da ureia, a deficiência de Ni leva a redução do metabolismo do N, o que pode provocar acúmulo de ureia e diminuição da síntese de aminoácidos (GERENDAS et al., 1999).

Em plantas com baixo fornecimento de Ni e com adubação de ureia, pode ocorrer a toxicidade da ureia. A aplicação foliar de ureia é frequentemente associada com a toxicidade da ureia e da gravidade de sintomas de toxicidade estão relacionados com o estado nutricional do Ni das plantas de soja. Em plantas sem fornecimento de Ni via raízes, a atividade da urease em folhas foi baixa e aplicação foliar de ureia levou à acumulação de ureia e necrose severa das pontas da folha (BROADLEY et al., 2012).

Na maioria das leguminosas incluindo soja, mais de 90% do N fixado exportado dos nódulos para raízes e parte aérea estão na forma de ureídeos (alantoína e ácido alantóico) (REIS et al., 2014). O catabolismo dos ureídeos vai formar ureia, no qual será necessária a ação da urease para a reciclagem do N em

outros aminoácidos (WITTE, 2011). Desta forma a enzima urease, em plantas de soja, com altas concentrações de ureídeos derivados da FBN, tem função na assimilação do N. Estudos mostraram que folhas deficientes em Ni exibem altos níveis de ureia, além dos acúmulos de ácido láctico e oxálico, e indicam atividade reduzida da urease (BAI; REILLY; WOOD, 2006). A demanda de N na planta é influenciada pela hidrólise da ureia, a deficiência de Ni causa redução no metabolismo do N, diminui a síntese de aminoácido e causa acúmulo de ureia (GERENDAS; SATTELMACHER, 1997; WITTE, 2011)

2.6 Aplicação do Ni via semente

Kutman, Kutman e Cakmak (2013) constataram respostas à adubação com Ni e ureia, principalmente quando o teor de Ni era baixo e médio na semente ($0,04 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,62 \text{ mg kg}^{-1}$). Estes autores observaram que as reservas de Ni em sementes de soja, juntamente com o fornecimento foliar deste micronutriente favorece o melhor aproveitamento do N-ureia aplicado via foliar. Estes autores observaram ainda que quando existem níveis altos de Ni em sementes ($8,32 \text{ mg kg}^{-1}$), este nutriente auxilia na prevenção de danos causados pela aplicação foliar de ureia por auxiliar na hidrólise da ureia e consequente remobilização do N, via floema.

A concentração crítica de Ni necessária para a germinação de sementes de cevada, crescimento da parte aérea na aveia, cevada e trigo, e crescimento de ramos de tomate adubados com ureia, arroz e abobrinha foi de 100 mg g^{-1} de massa seca (GERENDAS et al., 1999). Apesar da exigência da planta por Ni e pela demonstração de sua essencialidade por diversos autores, atualmente não existe uma dose oficial recomendada de Ni para tratamento de semente em soja. Normalmente o tratamento de semente com micronutrientes tem sido feito com o objetivo de potencializar a FBN, e neste sentido as doses de Mo e Co já foram definidas pela pesquisa e são bastante usuais no sistema agrícola. Todavia, são necessários experimentos e resultados de pesquisas para definir doses de Ni no tratamento de semente de soja.

2.7 Técnicas para quantificar a FBN

Os primeiros esforços em avaliar a contribuição da FBN foi por meio da utilização de um inibidor competitivo da enzima nitrogenase, que uma vez presente na atmosfera era reduzido preferencialmente: o acetileno. Neste método substituiu-se parte da atmosfera por acetileno, que é reduzido a etileno e medido em um cromatógrafo a gás (REIS et al., 2006). Várias modificações foram efetuadas no método original para minimizar críticas como estas e outras advindas da dificuldade de difusão de gases em sistemas inundados, além da dificuldade de medir a contribuição de bactérias diazotróficas e não de algas fotossintéticas e também fixadoras, etc. O principal problema advindo deste método era a presença de O₂ atmosférico, visto que sistemas nodulantes apresentam queda imediata da atividade da nitrogenase após distúrbios físicos aplicados ao sistema radicular, mesmo sabendo-se que barreiras físicas protegem os nódulos do efeito inibidor do oxigênio (REIS et al., 2006).

A técnica de abundância natural do ¹⁵N refere-se à marcação natural deste isótopo no solo (BODDEY et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2008). Plantas que recebem contribuições significativas da FBN acumularão quantidades deste elemento de duas fontes: solo e ar, fazendo com que haja diluição desta marcação natural (abundância natural). No Brasil, trabalhos pioneiros sob condições de campo, utilizando-se a técnica com ¹⁵N de baixo enriquecimento foi desenvolvido por Trivelin et al. (1984), visando desenvolver métodos de medição direta da fixação do N₂ atmosférico em leguminosas. Com o advento de espectrômetros de massa mais sensíveis foi possível estimar a contribuição da FBN em plantas noduladas (SHEARER; KOHL, 1986; BODDEY et al., 2001). A abundância natural de ¹⁵N é útil para quantificar a contribuição da FBN e considera a contribuição da FBN no ciclo completo em leguminosas, tais como a soja. Especificamente, a técnica baseada na abundância natural de ¹⁵N, sendo mais apropriada para avaliações em sistemas agrícolas e, quando aplicadas adequadamente, os resultados são os mais precisos (TRIVELIN et al., 1984; REIS et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2008).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do solo e área experimental

O experimento foi realizado no período de fevereiro de 2014 a maio de 2014, em casa-de-vegetação na área de pesquisa do Departamento de Engenharia de Biosistemas da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP).

O clima da região é do tipo Cwa, isto é subtropical úmido, com três meses seco (junho, julho e agosto) caracterizado por chuvas no verão e seca no inverno. Os dados de temperatura e umidade do interior da casa-de-vegetação são mostrados na Figura 1.

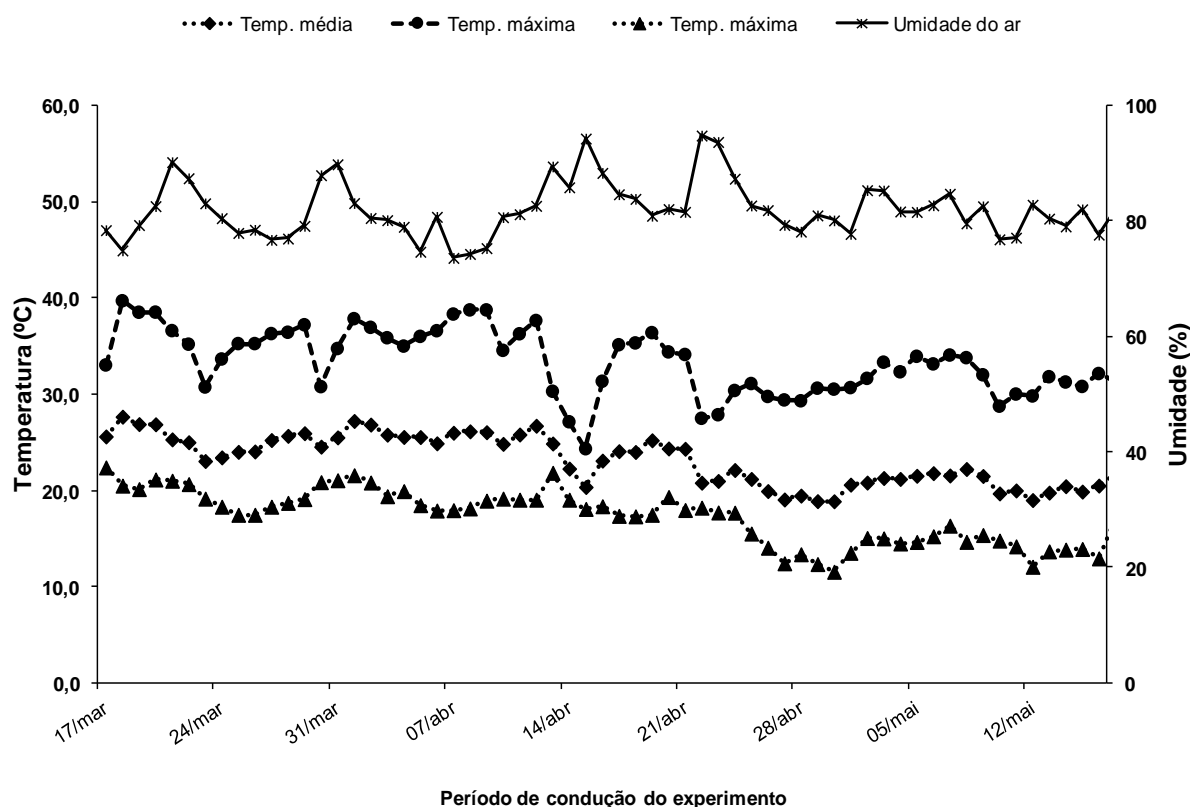


Figura 1 - Temperatura máxima, mínima, média (°C) e umidade relativa (%) do ar dentro da casa de vegetação durante a condução do experimento

O solo utilizado para o experimento foi coletado no município de Piracicaba – SP, dentro do campus "Luiz de Queiroz", no local conhecido como "aeroporto". O solo foi classificado como LATOSSOLO VERMELHO AMARELO, (EMBRAPA, 2006). A terra foi coletada em uma área cultivada na camada superficial do solo (0-20 cm). As características físicas da amostra revelaram um solo de textura arenosa, com 160 g kg⁻¹ de argila, 20 g kg⁻¹ de silte e 820 g kg⁻¹ de areia, sendo 550 (g kg⁻¹) de areia fina e 270 (g kg⁻¹) de areia grossa. As características químicas são apresentadas na Tabela 1.

A espécie cultivada foi *Glycine max* (L.) Merrill, cultivar BMX POTÊNCIA RR. Este genótipo é um dos cultivares mais plantados no país, apresenta hábito de crescimento indeterminado, ciclo precoce e grupo de maturidade de 6.7. O experimento foi instalado no dia 17 de fevereiro de 2014 e as plantas foram colhidas no final do ciclo reprodutivo (no estágio fenológico R7 – maturidade dos grãos), em 30 de maio de 2014.

Tabela 1 - Caracterização química do LATOSSOLO VERMELHO AMARELO utilizado no experimento de casa-de-vegetação para o plantio da soja

Profundidade	pH	MOS ⁽¹⁾	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC	V
cm	CaCl ₂	g kg ⁻¹	mg kg ⁻¹	mmol _c kg ⁻¹						%
0-20	5,6	9	19	0,6	24	6	0	13	44,3	70
	S	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Ni[§]			
	mg dm ⁻³									
	2,5	0,51	0,6	23	4	0,9	0,03			

MOS: determinado pelo teor de Carbono Orgânico Total do Solo segundo método de Walkey-Black (Raij et al., 2001); P, K, Ca e Mg: extração com resina trocadora de íons (CANTARELLA et al., 1998; RAIJ et al., 2001); Al extraído com 1 N KCl (Raij et al., 2001); H+Al determinado pela solução tampão SMP; (QUAGGIO et al., 1985); CTC: capacidade de Troca de Cátions; V: Saturação de bases.

[§]Ni: DTPA pH a 7,0.

As plantas foram cultivadas em vasos de plástico, com a capacidade de 3,0 dm³ de solo, mantendo-se duas plantas por vaso. O solo utilizado, por não ter sido cultivado com leguminosas e aliado a experiências anteriores de discentes que em experimentos soja na mesma casa-de-vegetação, relataram dificuldade de

desenvolvimento inicial das plantas por falta de N, fez-se a opção de garantir o suprimento inicial de todos os tratamentos com pequena dose de N-Ureia (10 mg dm^{-3}), equivalente a dose de 20 kg ha^{-1} , para suprir o desenvolvimento inicial das plantas (HATFIELD et al., 1974). A dose de K como K_2SO_4 foi de 150 mg dm^{-3} , aplicadas no plantio e, em cobertura, nos estádios fenológicos V1 e V5. O P como $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ foi de 200 mg dm^{-3} . Os micronutrientes (mg dm^{-3}): 0,5 de B – como ácido bórico; 2,0 de Fe – como EDTA; 1,0 de Cu; 5,0 de Mn e 5,0 de Zn, como sulfato foram aplicados no dia anterior ao plantio.

Foi realizada a etapa de tratamento de semente em 1 kg da cultivar BMX POTÊNCIA RR, com molibdênio e cobalto, na dose de 450 e 45 mg kg^{-1} , respectivamente. Em seguida, foi realizada a aplicação das doses de Ni para cada tratamento: 0, 45, 90, 135, 180, 360 e 540 mg kg^{-1} de semente, na forma de sulfato de Ni. Previamente na calda açucarada, adicionaram-se 2,0 mL kg^{-1} do produto comercial líquido SEMIA 5019 e SEMIA 5079, que continha estirpes de *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente. Posteriormente, as sementes foram umidecidas com calda açucarada a 10%, com a adição de 6,0 mL da calda para o volume total de sementes tratadas (1 kg) com o objetivo de melhorar a aderência do inoculante na semente (EMBRAPA, 2011). O tratamento da semente foi realizado logo no início da manhã e a semeadura foi realizada em seguida na profundidade de 2,0 cm do solo contido no vaso. O restante do volume total de semente tratada que não foi utilizada, foi descartada em local apropriado. Não foi adicionado nenhum tipo de fungicida e inseticida por ocasião do tratamento das sementes.

Foi realizada a correção da umidade do solo durante a condução do experimento, mantendo em 60% da capacidade máxima de retenção de água (ISO, 2003). As plantas foram conduzidas até o estágio R7 (época de colheita). Foram semeadas no mesmo solo e no mesmo local, duas espécies não fixadores de N atmosférico, que foram o painço *Panicum miliaceum* e o alpiste *Phalaris canariensis*, sendo que estas plantas foram utilizadas como plantas referência para servir como indicador do enriquecimento de ^{15}N disponível no solo (PEOPLES et al., 1989; BODDEY et al., 2001; BRITO; MURAOKA; SILVA, 2009; URQUIAGA et al., 2012).

3.2 Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento inteiramente ao acaso (DIC), com sete tratamentos (doses de Ni) e oito repetições, sendo que quatro repetições foram conduzidas até o estágio fenológico R1, ocasião em que as plantas foram coletadas para realização de avaliações nodulares do sistema radicular e atividade enzimática da nitrogenase e urease. O restante das plantas foi mantido até o estágio R7, necessário para a avaliação da produção de massa seca de grãos e da massa seca de parte aérea e de raízes. A unidade experimental foi constituída por um vaso com duas plantas e foram dispostas numa bancada a 10 cm de altura do piso.

3.2 Avaliações

3.2.1 Coleta de folha e determinação das concentrações de nutrientes

As folhas utilizadas para diagnose (terceira ou quarta folha a partir do ápice da haste principal com pecíolo) foram colhidas no estágio fenológico R1 para determinação das concentrações de nutrientes, cerca de 45 dias após a emergência das plântulas. O material devidamente identificado foi acondicionado em sacos de papel, seco em estufa a 65°C durante 72 horas e pesado em balança de precisão. Posteriormente, foi triturado em moinho tipo Willey (peneira com diâmetro de malha de 1 mm) e enviado para o laboratório para a determinação das concentrações de macro e micronutrientes, conforme metodologia descrita em Malavolta et al. (1997).

A partir do início da senescência (R3-R4), as folhas caídas passaram a ser coletadas para a pesagem da massa de matéria seca final e análises químicas de tecido. Aproximadamente, aos 105 dias após o plantio (no estágio fenológico R7), as plantas foram coletadas, separando-as em grãos e parte aérea total (caule, vagem, folhas verdes e secas), para posteriores análises da concentração dos nutrientes.

3.2.2 Determinação do índice SPAD

O medidor de clorofila SPAD 502 fornece leituras em unidades SPAD que correspondem ao teor de pigmento presente na folha. Este equipamento é utilizado para estimar a concentração de N na folha indiretamente.

O clorofilômetro possui diodos que emitem radiação em dois comprimentos de onda. Um em 650 nm (luz vermelha) e outro em 940 nm (radiação infra vermelha). A luz atravessa a folha e é recebida por um fotodiodo de silicone, onde é convertida inicialmente em sinais elétricos e, posteriormente, em sinais digitais. Estes sinais passam por um processador que calculam os valores proporcionais aos de teor de clorofila presentes na folha (MINOLTA, 1989; JESUS; MARENCO, 2008).

O sinal derivado da emissão em 650 nm serve para o cálculo do teor relativo de clorofila, ao passo que o outro sinal (940 nm) atua como um fator de correção devido a existência de moléculas do tecido vegetal desprovidas de clorofila (MINOLTA, 1989; JESUS; MARENCO, 2008).

Foi realizada a quantificação não destrutiva dos teores relativos de clorofila utilizando o clorofilômetro portátil SPAD 502 (Minolta, Japão). As leituras foram realizadas utilizando o terço médio da planta diagnose, no estágio fenológico R1, sendo computadas a média de 30 leituras por planta.

3.2.3 Determinação de N-total e quantificação da FBN (abundância natural de ^{15}N)

Para a quantificação da FBN pelas plantas de soja neste estudo, foi utilizada a técnica da abundância natural de ^{15}N (TRIVELIN et al., 1984; SHEARER; KOHL, 1986). Esta técnica baseia-se no fato de que, geralmente, o N do solo é levemente enriquecido com o isótopo ^{15}N em comparação ao N_2 do ar (TRIVELIN et al., 1984; SHEARER; KOHL, 1986). O N do ar apresenta cerca de 0,3663% de ^{15}N e o restante (99,6337%) de ^{14}N (BODDEY et al., 2001). No entanto, devido à discriminação isotópica que ocorre durante as transformações do nitrogênio no sistema solo-planta, ambos podem apresentar valores de ^{15}N um pouco maiores que os encontrados na atmosfera. Estas variações são extremamente pequenas,

então se convencionou que cada unidade de delta ^{15}N seria a abundância natural dividida por mil, ou seja, 0,0003663 átomos % de ^{15}N em excesso (TRIVELIN et al., 1984; SHEARER; KOHL, 1986).

Espécies capazes de obter do ar a maior parte do N necessário para sua nutrição apresentarão valores de $\delta^{15}\text{N}$ bem próximos a zero, uma vez que a maior parte virá do N do ar que é o padrão da técnica, e possui 0,3663 % de ^{15}N , ou seja, zero unidades de $\delta^{15}\text{N}$ em excesso (TRIVELIN et al., 1984; SHEARER; KOHL, 1986; BODDEY et al., 2001). Por outro lado, as espécies não-fixadoras (plantas controle) crescendo no mesmo solo, terão valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que todo ou a maior parte do N necessário para o seu desenvolvimento será derivado do solo. Assim como as outras técnicas isotópicas, essa depende da premissa básica de que as plantas fixadoras e não-fixadoras, crescendo no mesmo solo, absorvem N com a mesma marcação com ^{15}N (SHEARER; KOHL, 1986; BODDEY et al., 2001; GUIMARÃES et al., 2008). Esta limitação foi contornada selecionando-se espécies-referência, com desenvolvimento radicular e demanda de N semelhantes à planta avaliada.

A proporção de N das plantas fixadoras de N_2 provenientes do ar pelo processo da FBN foi calculada pela equação de Shearer & Kohl (1986):

$$\% \text{FBN} = 100 \times (\delta^{15}\text{N}_{\text{referência}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{soja}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{referência}} - B)$$

Em que:

$\% \text{FBN}$ = porcentagem de N proveniente da FBN na planta de soja;

$\delta^{15}\text{N}_{\text{referência}}$ = Abundância natural de ^{15}N na planta referência (não fixadora de N);

$\delta^{15}\text{N}_{\text{soja}}$ = Abundância natural de ^{15}N na soja.

B = valor de fracionamento do ^{15}N em relação ao ^{14}N pela planta de soja ao absorver N do solo. Neste experimento foi usado o valor médio de -1.17 ‰ com bases nos dados obtidos por Guimarães et al. (2008).

3.2.4 Determinação da atividade da enzima urease

As amostras de tecido fresco foram coletadas na parte da manhã, acondicionadas em sacos plásticos e em caixa de isopor com o objetivo de manter baixa temperatura e atividade enzimática. Esta coleta foi realizada nas folhas utilizadas para diagnose foliar, coletadas no estádio R1 das plantas de soja.

A determinação da atividade da urease *in vivo*, foi realizada conforme adaptação dos métodos descritos por McCullough (1967) e por Hogan et al. (1983). A incubação do material vegetal (200 mg de folhas verdes, cortadas em “fatias” de 1 mm de largura) foi adicionada em meio de 8 mL de tampão NaH_2PO_4 com uréia pH 7,4, durante três horas à temperatura de 30 °C e protegidas da luz com papel alumínio e agitação constante. Em 0,5 mL do extrato obtido após a incubação foram adicionados 2,5 mL do Reagente I (Fenol 0,1 mol L⁻¹, nitroprussiato de sódio – 170 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e 2,5 mL do Reagente II (NaOH 0,125 mol L⁻¹, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,15 mol L⁻¹, NaOCl - 3% Cl_2). Os tubos foram tampados para evitar a perda de NH_3 e colocados em banho maria a 37°C por 35 min. Após esse tempo, realizou-se a leitura colorimétrica da reação em espectrofotômetro a 625 nm. A atividade da urease foi determinada pela quantidade de amônio (NH_4^+) produzida, e os valores obtidos foram comparados a uma curva padrão, previamente estabelecida utilizando-se NH_4Cl como padrão de amônio. Os resultados obtidos nos tratamentos foram expressos em $\mu\text{mol NH}_3 \text{ g}^{-1} \text{ MF h}^{-1}$.

3.2.5 Determinação da atividade da enzima nitrogenase

A avaliação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi determinada ainda, de forma indireta pela técnica de redução do acetileno (ARA) (BODDEY et al., 2001). Para isto, as plantas foram coletadas no estádio R1, sendo que as raízes contendo os nódulos radiculares foram separadas cuidadosamente do solo, sendo os nódulos posteriormente colocados em frascos hermeticamente fechados. Com auxílio de uma seringa, cerca de 10% da fase gasosa do frasco (correspondendo ao volume de 1 mL) foram retirados e a mesma quantia de gás acetileno, com pureza de 98-99% foi injetada. Devido às grandes variações de tempo ideal de incubação com o gás acetileno descritas na literatura optou-se por um tempo de 1h, a fim de não superestimar a atividade da enzima e evitar possíveis problemas como a possibilidade de conversão do gás acetileno a etileno pela composição das rolhas

utilizadas para vedar os frascos. Para a obtenção da concentração de gás etileno formado no frasco, 1 mL da fase gasosa foi retirado com seringa de 2,5 mL, e injetado em um cromatógrafo a gás (*Thermo Finnigan*[®], *model Trace 2000GC*), com duas colunas *Porapack N*. O tempo de corrida para a determinação da concentração de etileno foi de 1 minuto.

Os valores de redução de acetileno obtidos em ppm (mg/L) foram transformados para micromol por hora de incubação ($\mu\text{mol h}^{-1}$), utilizando-se o seguinte cálculo:

Para se ter 1 mol de qualquer gás são necessários 22,4 L ou 22.400 mL de gás.

1 mol ---- 22.400 mL de gás

V1 ----- 1 mL (volume de gás injetado no cromatógrafo)

V1 = $4,46428 \times 10^{-5}$ mols

Valor da área do pico do etileno puro é igual a $4,46428 \times 10^{-5}$ mols

Exemplo:

Pico etileno 120000000 ----- $4,46428 \times 10^{-5}$ mols

Pico amostra 90000000 ----- V2

V2 = $3,348 \times 10^{-5}$ moles p/ 1h (tempo de incubação)

Em que: V1 é o número de mols contidos em 1mL de gás etileno padrão que foi injetado no cromatógrafo. V2 é o número de mols contidos em 1 mL de gás de cada amostra injetado no cromatógrafo (BODDEY et al., 2001). Os dados foram transformados para log₁₀ e submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância para comparação de médias através do programa SAS versão 9.1

3.2.6 Massa seca de parte aérea e produção de grãos

Ao final do experimento, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea total (folhas, caule e vagem) e grãos. O material foi identificado, acondicionado em sacos de papel e seco em estufa a 65°C durante 72 horas. Após este procedimento foi realizado a pesagem da parte aérea total. Para a determinação de produção de grãos por planta, após a secagem dos grãos, foi realizada a pesagem dos grãos em balança de precisão de 0,001 g.

3.2.7 Determinação das concentrações e acúmulo de Ni no grão da soja

Ao final do experimento, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea total (folha seca, caule e vagem) e grãos. O material foi identificado, acondicionado em sacos de papel e secado em estufa a 65 °C durante 72 horas. Posteriormente, foi pesado, triturado em moinho tipo Wiley (peneira com diâmetro de malha de 1 mm) e realizadas as determinações químicas de Ni nos tecidos vegetais, de acordo com metodologia descrita por Malavolta et al. (1997). As quantidades acumuladas (concentração) dos nutrientes nos tecidos vegetais foram calculadas pela multiplicação da concentração com o valor da massa de matéria seca de cada parte da planta.

3.3 Análise dos dados

As análises estatísticas foram feitas no software SAS (2009) e Sisvar (FERREIRA, 2011). Os dados foram analisados preliminarmente por meio de parâmetros descritivos: média, desvio padrão, coeficiente de variação e quando necessário, houve a transformação dos dados para satisfazer os critérios de homogeneidade e homocedasticidade. Os dados foram submetidos ainda à análise de variância, pelo teste F. Quando o efeito das doses de Ni foi significativo, realizou-se um estudo de regressão linear e quadrática. Em todas as análises descritas acima, o nível de significância adotado foi igual a 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentrações foliares de nutrientes

De maneira geral as condições climáticas de temperatura e umidade foram favoráveis para o desenvolvimento da soja e não apresentou condições extremas que pudessem comprometer o desenvolvimento das plantas (Figura 1). A temperatura variou de 20 a 39 °C com média de 29 °C e a umidade do ar permaneceu por volta de 80%, valores favoráveis para o desenvolvimento da cultura.

A aplicação de doses de Ni via semente influenciou as concentrações foliares dos macronutrientes P, K, Ca e S. As concentrações de P variaram de 2,1 a 3,1 (g kg⁻¹), respectivamente, para as doses 0 e 540 (mg kg⁻¹) de Ni via semente. As concentrações de K variaram de 24 a 35 (g kg⁻¹), respectivamente, nas doses 0 e 360 (mg kg⁻¹). O Ca variou de 16 a 24 (g kg⁻¹), respectivamente nas doses 0 e 135 (mg kg⁻¹) (Figura 2). Foi observado efeito quadrático para as concentrações foliares de P, K e Ca, ocorrendo de maneira geral redução das concentrações foliares destes nutrientes nas maiores doses de Ni. Por outro lado, observou-se efeito linear para a concentração do S na folha, variando de a 2,1 a 3,8 (g kg⁻¹), respectivamente nas doses 0 e 540 (mg kg⁻¹) para as doses de Ni fornecidas via semente.

Não foi observado efeito significativo das concentrações de N e Mg foliares para as doses de Ni aplicadas via semente (Figura 2). Estes resultados são semelhantes àqueles descritos por Rodak (2014), de que não foi observada diferença nas concentrações de N nas folhas de plantas de soja cultivadas em dois solos de texturas franco arenoso e muito argiloso, e submetido a doses de Ni. A ausência de resposta quanto à concentração de N foliar pode ser explicada, principalmente pelo efeito diluição, em que as plantas apresentaram maior crescimento e desenvolvimento, notadamente nos tratamentos com as doses intermediárias de Ni. A época de amostragem das folhas foi realizada no estágio R1, neste período, grande parte do N foliar é remobilizado para estruturas reprodutivas principalmente flores e posteriormente para a vagem e grão, e conseqüentemente observa-se diminuição na concentração do N foliar (RITCHIE et al., 1994; CÂMARA, 2014). Exceto para o N, os resultados das concentrações foliares dos macronutrientes estão no limiar das faixas de suficiências sugerido para a cultura da

soja e não limitaram o desenvolvimento da cultura (VITTI; TREVISAN, 2000; MALAVOLTA, 2006).

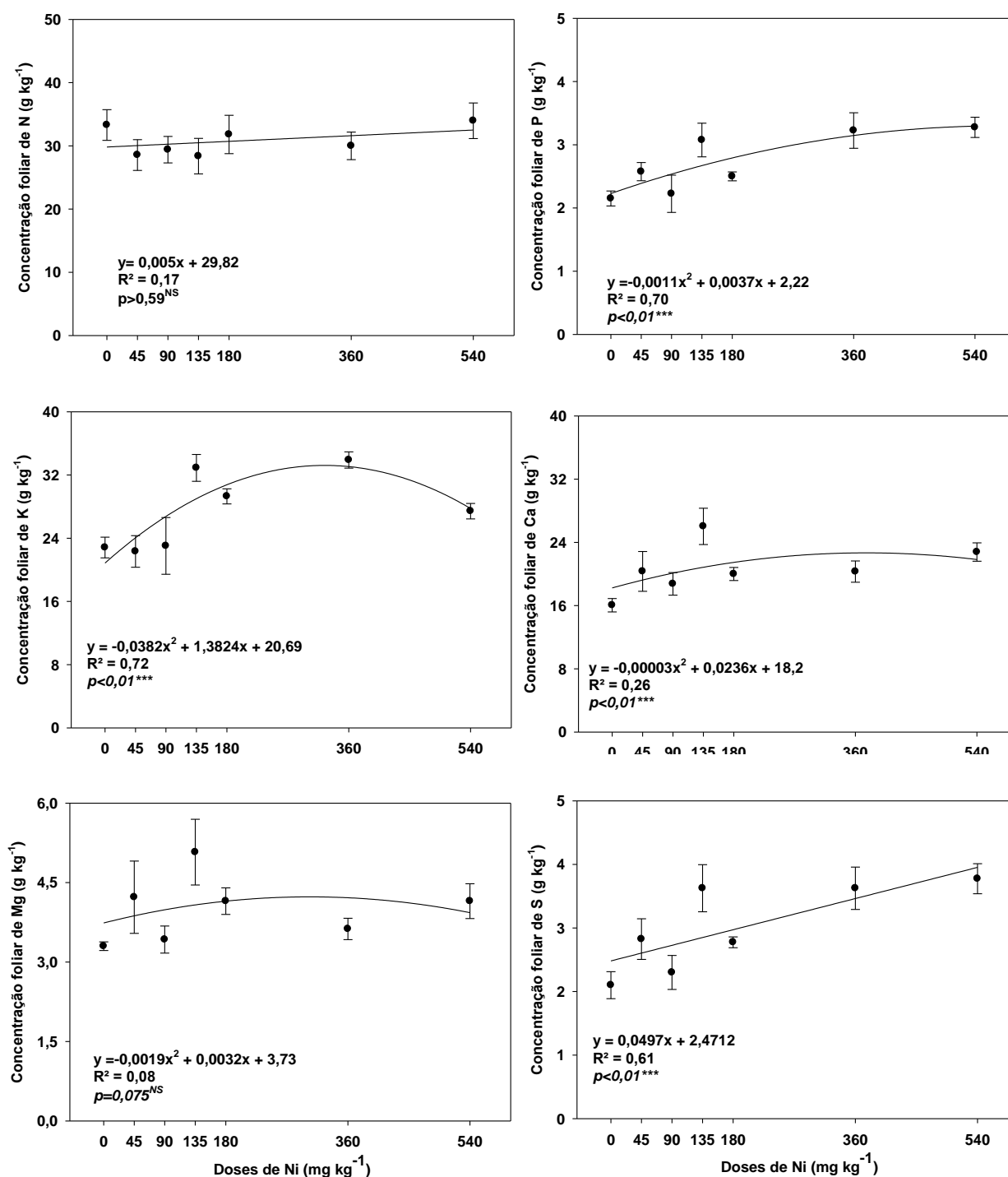


Figura 2 - Concentração de macronutrientes (mg kg⁻¹) nas folhas utilizadas para diagnose (coletadas no estágio fenológico R1) das plantas de soja (cultivar BMX Potência), em função de doses de Ni via semente. *,** e *** indicam efeito significativo de $P \leq 0,1$; 0,05 e 0,001, respectivamente. NS-não significativo. As barras representam o erro padrão médio em relação à média (n=4)

Em relação aos micronutrientes, exceto para o Cu, observou-se que os teores determinados nas folhas utilizadas para diagnose apresentaram valores superiores às concentrações foliares já estabelecidas pela faixa de suficiências na literatura (VITTI; TREVISAN, 2000; MALAVOLTA, 2006). A aplicação das doses de Ni na semente proporcionou diferenças nas concentrações dos micronutrientes Fe, Zn, B e Ni nas folhas (Figura 3). Em relação ao Fe, a concentração variou 320 a 500 mg kg⁻¹, respectivamente, para as doses 0 e 540 mg kg⁻¹ de Ni, enquanto a faixa estabelecida na literatura é de 50 a 350 mg kg⁻¹. A concentração foliar de Zn variou de 100 a 180 mg kg, respectivamente nas doses de 0 a 540 mg kg⁻¹ de Ni via semente, a faixa estabelecida na literatura é de 20 a 50 mg kg⁻¹. A concentração de B variou de 78 a 125 mg kg⁻¹, contudo, não foram observadas diferenças nas concentrações foliares de Mn e Cu. Kochian (1991) citado por Gerendas et al. (1999) sugere que os íons Cu²⁺ e Zn²⁺ exercem efeito interiônico de inibição competitiva como o Ni²⁺ no processo de absorção, indicando que estes três íons são absorvidos pelos mesmos canais iônico. Porém no presente estudo, o efeito foi inverso, ou seja, as doses de Ni elevaram a concentração foliar do Zn na folha, podendo-se aventar que, a forma de aplicação do Ni na semente pode ter influenciado de maneira positiva na redução desta inibição competitiva (GERENDAS et al., 1999).

A aplicação de Ni na semente influenciou a concentração foliar deste elemento na folha utilizada para diagnose (amostrada no estágio fenológico R1) (Figura 3). A concentração de Ni variou de 0,09 a 1,21 mg kg⁻¹, respectivamente, para as doses 0 e 135 mg kg⁻¹. Concentrações semelhantes às obtidas neste estudo para folhas de soja foram verificados por Rodak (2014) que foram da ordem de 0,08 a 2,78 mg kg⁻¹, em plantas cultivadas em solos arenosos e de 0,17 a 1,6 mg kg⁻¹ em plantas desenvolvidas em solos argilosos. Os teores mais elevados observados em solos arenosos podem ser explicados pela pronta disponibilidade de Ni na solução do solo franco arenoso, pois, devido à menor área superficial específica da fração sólida do solo ocorre menor adsorção de Ni, conseqüentemente, menor efeito tamponante. Enquanto no solo muito argiloso ocorre fornecimento gradativo de Ni para as plantas, devido a maior adsorção do Ni nos minerais silicatados da fração argila, MOS e os óxidos de Fe e Mn (RODAK, 2014).

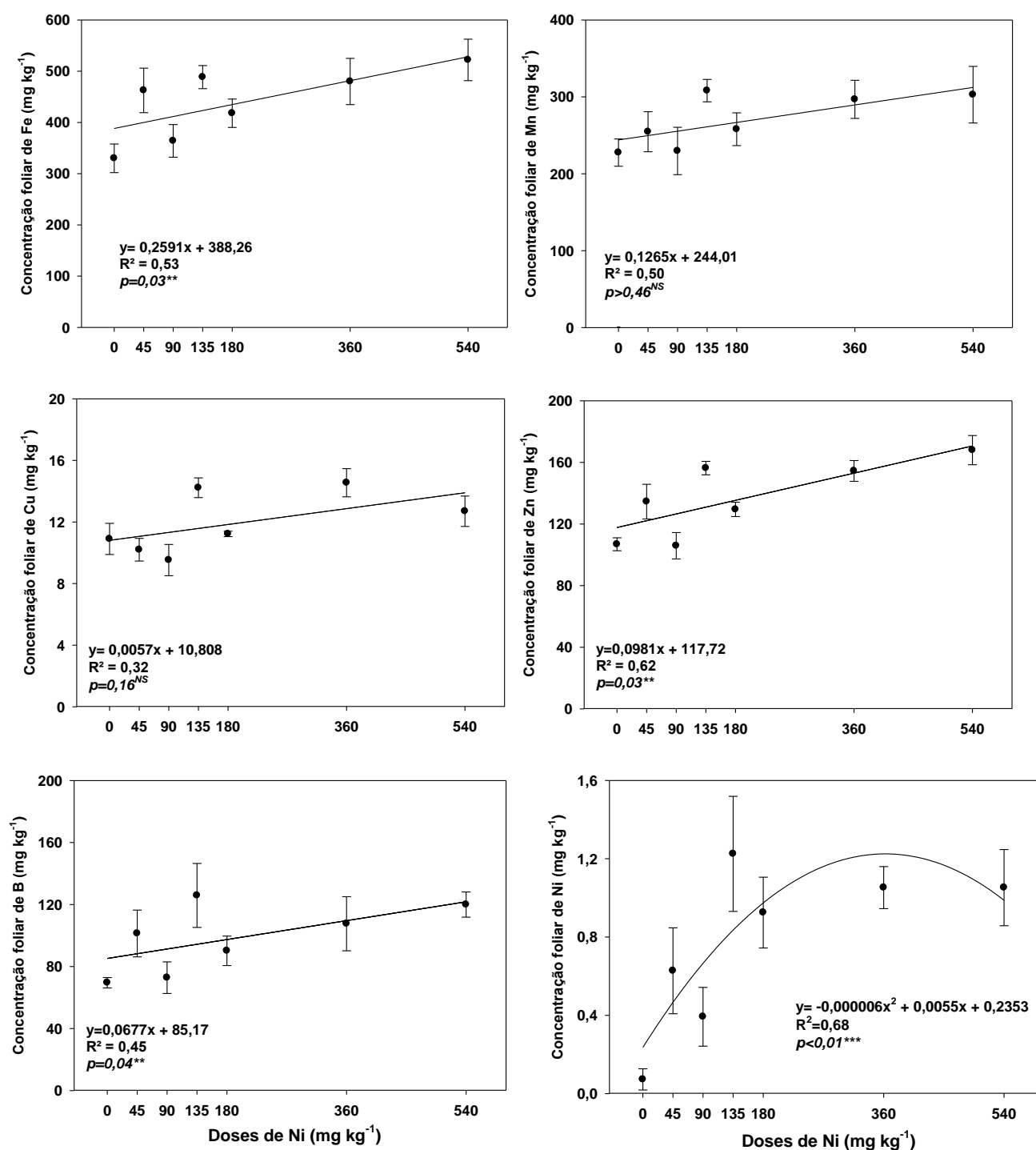


Figura 3 - Concentração de micronutrientes (mg kg⁻¹) nas folhas utilizadas para diagnose (coletadas no estágio fenológico R1) das plantas de soja (cultivar BMX Potência), em função de doses de Ni via semente. *, ** e *** indicam efeito significativo de $P \leq 0,1$; 0,05 e 0,001, respectivamente. NS-não significativo. As barras representam o erro padrão médio em relação à média (n=4)

Kutman, Kutman e Cakmak (2013), estudando diferentes concentrações de Ni na semente sendo baixo-Ni ($0,04 \text{ mg kg}^{-1}$), médio-Ni ($0,62 \text{ mg kg}^{-1}$) e alto-Ni ($8,32 \text{ mg kg}^{-1}$) e com aplicação foliar de Ni em solução, observaram que as concentrações de Ni não afetaram a taxa de germinação e desenvolvimento da planta, sendo os valores de concentrações de $0,04$ a $8,32 \text{ mg kg}^{-1}$ de Ni na folha diagnose. Entretanto, para as folhas novas das plantas, nas quais houve aplicação de Ni em solução, as concentrações de Ni na folha foram superiores a 10 mg kg^{-1} .

O aumento das concentrações de Ni na parte aérea da planta com a aplicação de doses de Ni já foram mostrados também em outras culturas. Para Paiva et al. (2003), a elevação das concentrações de Ni nas folhas novas de mudas de ipê-roxo, resultado do incremento das concentrações de Ni na solução nutritiva, mostrou que este elemento é móvel no floema. Pereira (2006) observou aumento das concentrações de Ni na matéria seca das raízes, caules, folhas e grãos de feijão com a aplicação de doses de $8, 16, 32, 64$ e 128 g ha^{-1} Ni aplicadas em Latossolos. Este efeito aconteceu também neste estudo, ou seja, observou-se aumento da concentração foliar de Ni com o incremento das doses de Ni aplicadas via semente. Portanto, há indicação que existe uma correlação entre a dose de Ni aplicada e a concentração foliar, independente da forma aplicada, seja no solo ou tratamento de semente.

4.2 Índice SPAD, acúmulo de N, ^{15}N e FBN

A concentração de clorofila das folhas de soja foi indiretamente avaliada pelo índice SPAD nos estádio R1, aos 45 dias após a emergência. O efeito das doses de Ni via semente influenciaram positivamente no índice SPAD, com valores variando de 28 a 33, respectivamente, nas doses 0 e 135 mg kg^{-1} de Ni aplicadas via semente (Figura 4). Foi observado efeito quadrático para o valor SPAD, sendo que nas doses mais elevadas 360 e 540 mg kg^{-1} de Ni constataram-se menores valores de SPAD em relação às doses mais baixas. O uso de clorofilômetro, tem se mostrado eficiente para predizer o estado nutricional das plantas, e em alguns trabalhos tem-se constatado a existência de correlação entre as leituras do índice SPAD e o teor de clorofila e N-total (LAVRES JUNIOR; SANTOS JUNIOR; MONTEIRO, 2010; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013).

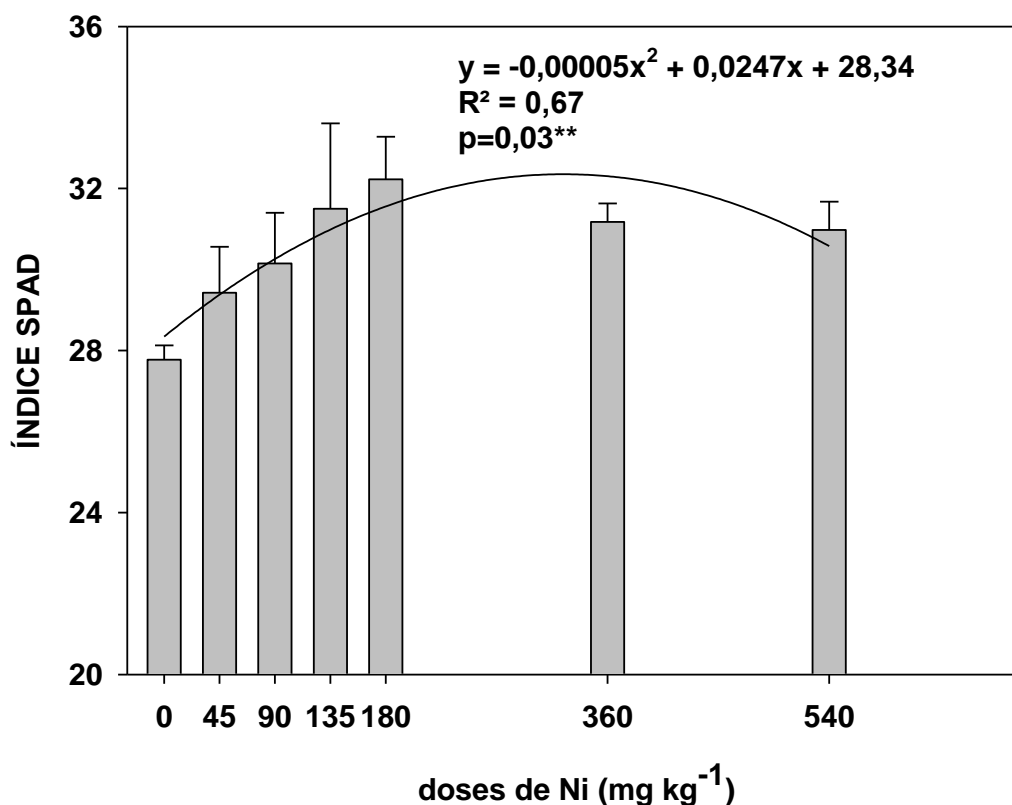


Figura 4 - Valores de SPAD em folhas utilizadas para a diagnose (coletadas no estágio fenológico R1), das plantas de soja (cultivar BMX Potência), em função de doses de Ni via semente. *,** e *** indicam efeito significativo de $P \leq 0,1$; 0,05 e 0,001, respectivamente. NS-não significativo. As barras representam o erro padrão médio em relação à média (n=4)

Kutman, Kutman e Cakmak (2013) observaram efeito positivo do Ni nos valores de SPAD em relação aos diferentes níveis de Ni na semente e ainda com aplicação externas de Ni. Estes autores observaram que as plantas cultivadas sem fornecimento externo de Ni apresentaram as menores leituras SPAD, enquanto que as plantas cultivadas com aplicações externas de Ni na solução exibiam maiores valores SPAD. Ou seja, o fornecimento de Ni na solução tende a aumentar os valores de SPAD, mesmo na ausência de aplicação foliar de ureia. O mesmo efeito foi observado neste estudo, em que houve efeito do Ni nas leituras de SPAD indicando indiretamente aumento do conteúdo de clorofila.

A aplicação de doses de Ni via semente influenciou positivamente no acúmulo de N no grão e na parte aérea da soja no estágio final de colheita (R7) (Figura 5). O acúmulo de N-total na parte aérea (folhas verdes, folhas secas, caule e vagem) variou de 80 a 170 mg por planta, respectivamente para as doses de Ni de 0 e 360 mg kg⁻¹. O mesmo efeito também foi observado para o acúmulo de N-total no grão, o qual variou de 240 a 400 mg por planta, respectivamente para as doses de Ni de 0 e 360 mg kg⁻¹.

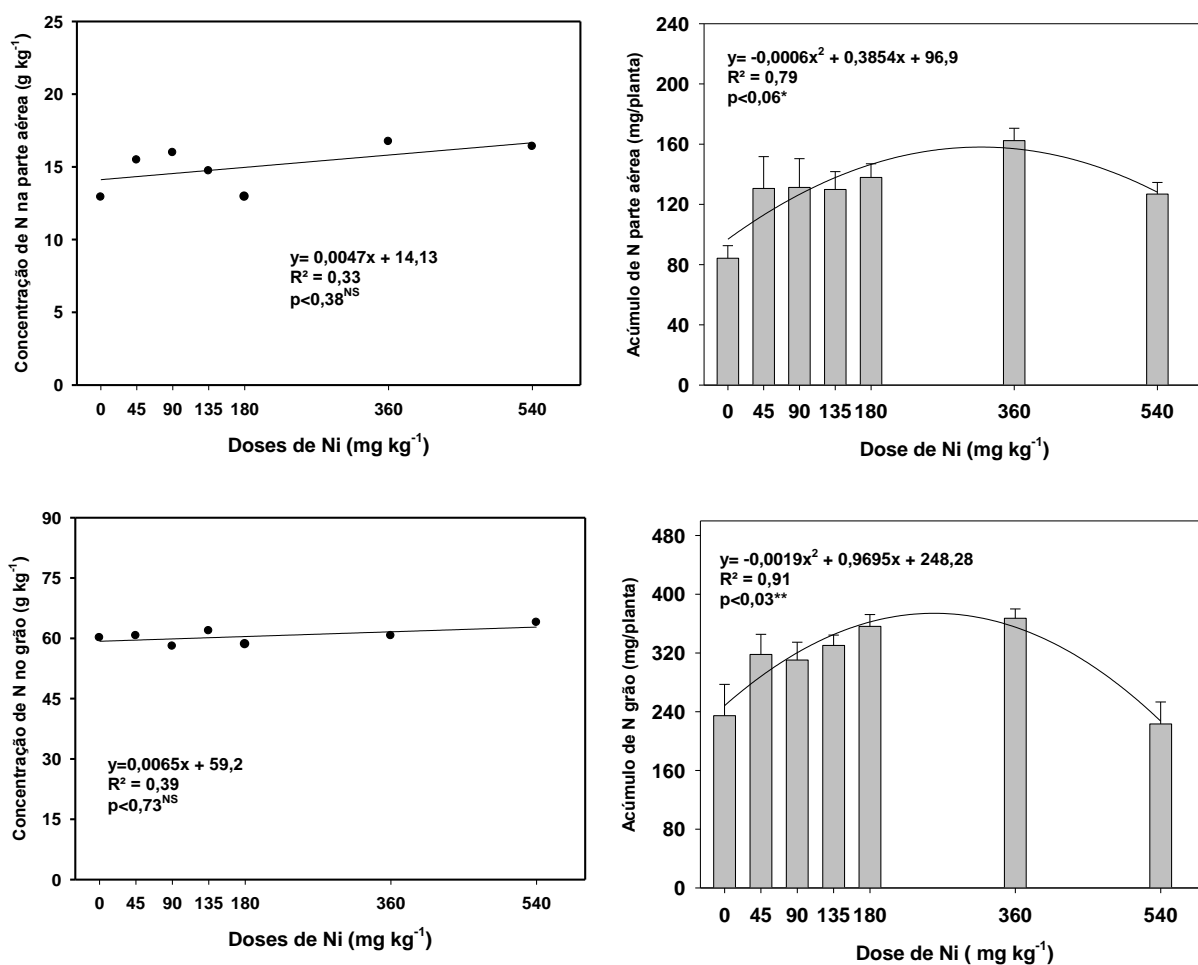


Figura 5- Concentração e acúmulo de N nos grãos e na parte aérea (coletadas no estágio fenológico R7), das plantas de soja (cultivar BMX Potência), em função de doses de Ni via semente. *, ** e *** indicam efeito significativo de $P \leq 0,1$; 0,05 e 0,001, respectivamente. NS-não significativo. As barras representam o erro padrão médio em relação à média (n=4)

Em ambas as partes, parte aérea e grão, houve efeito quadrático, sendo que a maior dose de Ni aplicada (540 mg kg^{-1}), resultou em menor acúmulo de N de aproximadamente 120 e 225 mg por planta, respectivamente, parte aérea e grãos. Este efeito ocorreu pelo menor acúmulo de biomassa da parte aérea e pelo valor de massa seca do grão que possivelmente foram reduzidos em função do efeito de toxidez de Ni na dose mais elevada (540 mg kg^{-1}).

Rodak (2014) observou que plantas de soja cultivadas sob aplicação de alta dose de Ni apresentaram sintomas de toxidez, com redução dos componentes de produtividade e de acúmulo de N total. Sintomas de toxidez já foram destacados por outros pesquisadores em feijão (PEREIRA, 2006), em soja (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013; RODAK, 2014), em alface (PEREIRA, 2006), em ipê-roxo (PAIVA et al., 2003) em azevém e cevada (GERENDAS; SATTELMACHER, 1997; GERENDAS et al., 2009).

Neste estudo a FBN foi estimada pela técnica da abundância natural de ^{15}N (UNKOVICH et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2008) (Tabela 2). Por meio dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ do grão e da parte aérea da soja foi possível calcular a FBN no fim do ciclo da cultura (no estágio fenológico R7). Foram utilizadas como plantas controles do valor de $\delta^{15}\text{N}$, as espécies *Panicum miliaceum* e *Phalaris canariensis* que apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ de 6,05‰ e 5,14‰, respectivamente. Estas plantas controles (não fixadores de N) foram conduzidas no mesmo solo, período e condições climáticas do experimento da soja, podendo desta forma estimar indiretamente a FBN por meio da técnica de abundância natural de ^{15}N (LEDGARD et al., 1984; BODDEY et al., 2001; UNKOVICH et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2008).

Na parte aérea da soja os valores de $\delta^{15}\text{N}$ variaram de 1,53 a 0,91 e de FBN variaram 61 a 70% na média, respectivamente, para as doses 0 e 360 mg kg^{-1} de Ni, não sendo constatadas diferenças entre as doses de Ni aplicadas (Tabela 2). Entretanto, foi observado efeito entre os tratamentos para os valores de $\delta^{15}\text{N}$ para os grãos, com variação dos valores de $\delta^{15}\text{N}$ de 0,42 a -1,72 e aumento da FBN de 77 para 99% em média, respectivamente, para as doses 0 e 45 mg kg^{-1} de Ni. Não foi observado efeito linear e quadrático para as doses de Ni tanto no grão, quanto na parte aérea. Todavia, a análise da abundância natural de delta ^{15}N no grão indica que houve diferença na FBN entre os tratamentos aplicados, em que a aplicação da dose de 45 mg kg^{-1} de Ni via semente indicou que 99% do N

acumulado nos grãos foi proveniente da FBN, enquanto que no tratamento controle (dose 0) a taxa de fixação do N foi de apenas 77%. Dessa forma a aplicação de Ni via semente estimulou a FBN, contribuindo para a nutrição nitrogenada na soja de forma altamente significativa, refletindo na produção de grãos.

Tabela 2 - Abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}\text{‰}$) e estimativa da FBN (%) na planta de soja (parte aérea total e grão) e atividade da redução do acetileno (ARA) em nódulos de soja cultivada em casa-de-vegetação submetidas a aplicação de doses de Ni no tratamentos de sementes

Doses de Ni (mg kg ⁻¹)	$\delta^{15}\text{N}\text{‰}$	FBN [‡]	FBN [§]	% FBN	ARA [£]
		%	%	Média	($\mu\text{mol h}^{-1}$)
		Grão			Nódulos
0	0,42 b	78 b	76 b	77 b	528 a
45	-1,14 a	100 a	98 a	99 a	880 a
90	-0,92 ab	97 ab	95 ab	96 ab	936 a
135	0,04 ab	83 ab	81ab	82 ab	778 a
180	-0,15 ab	86 ab	84 ab	85 ab	756 a
360	-0,35 ab	89 ab	87 ab	88ab	706 a
540	-0,81 ab	95 ab	93 ab	94 ab	793 a
<i>Pr>Fc</i>	0,036**	0,035**	0,037**	0,036**	0,15 ^{NS}
CV (%)	7,5	8,6	8,6	8,5	34,5
R ² linear	5,9 ^{NS}	5,9 ^{NS}	5,9 ^{NS}	5,9 ^{NS}	1,3 ^{NS}
R ² quadrática	6,3 ^{NS}	6,3 ^{NS}	6,3 ^{NS}	6,3 ^{NS}	11,4 ^{NS}
		Parte aérea			
0	1,53	62	61	62	-
45	1,42	64	63	63	-
90	0,96	70	69	70	-
135	1,41	64	63	63	-
180	1,62	61	60	61	-
360	0,91	71	70	70	-
540	1,41	64	63	63	-
<i>Pr>Fc</i>	0,97 ^{NS}	0,97 ^{NS}	0,97 ^{NS}	0,97 ^{NS}	-
CV (%)	8,6	23,2	23,2	23,2	-
R ² linear	4,3 ^{NS}	4,3 ^{NS}	4,3 ^{NS}	4,3 ^{NS}	-
R ² quadrática	16,5 ^{NS}	16,5 ^{NS}	16,5 ^{NS}	16,5 ^{NS}	-

†Média com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>5%).

‡ Valores de $\delta^{15}\text{N}$ na planta controle (não fixadora de N); Painço (*Panicum miliaceum*): 6,05‰ (n=4);

§ Valores de $\delta^{15}\text{N}$ na planta controle (não fixadora de N) ;Alpiste (*Phalaris canariensis*):=5,14‰ (n=4);

£Atividade da redução do acetileno (ARA).

Sabe-se que aproximadamente 40% do grão seco é composto por proteína, resultando em uma alta demanda de N e que a maior parte será fornecida via FBN (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; HUNGRIA et al., 2006; LUCA et al., 2014). Neste estudo, baixas doses de Ni (45 mg kg^{-1}) estimularam a FBN e o efeito foi mais destacado no grão. A ausência de resposta da FBN na parte aérea ocorreu por que no início do desenvolvimento da soja, o sistema de simbiose bactéria-soja ainda não está totalmente estabelecido (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003). Os nódulos são de tamanhos reduzidos e em pequeno número, e a planta está estabelecendo o processo de infecção, sendo baixa a demanda por N é, porém, essencial para o crescimento vegetativo. No período (V2-V3) a maior parte do N será suprida pelas reservas dos cotilédones e pela incipiente absorção radicular via solo (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; CÂMARA, 2014). Nesta fase inicial de desenvolvimento da cultura para a formação da parte aérea, a planta de soja pode ter absorvido maior N do solo e apresentaram valores de delta ^{15}N mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que grande parte do N necessário ao seu desenvolvimento foi derivada do N disponível do solo. (Tabela 2).

Por outro lado, quando o processo de simbiose bactéria-planta se estabelece em estágios vegetativos mais avançados, a planta obtém maior parte do N proveniente da FBN, uma vez que os valores de delta ^{15}N tendem a se aproximar de zero, indicando que o N absorvido e assimilado foi proveniente do ar atmosférico (GUIMARÃES et al., 2008; URQUIAGA et al., 2012). Neste caso, o Ni exerceu papel fundamental no processo de FBN, a aplicação de Ni na semente aumentou em média 10 % da FBN, contribuindo de forma significativa para a demanda do N, principalmente no grão. Sabe-se que o Ni, no processo de FBN atua como componente estrutural da hidrogenase, enzima responsável por recapturar o H_2 que é gerado pela nitrogenase durante o processo de redução do N_2 (EVANS et al., 1987). No processo de FBN a enzima nitrogenase realiza a quebra do N_2 e ocorre à transformação de NH_3 e do gás H_2 (URETA et al., 2005). A formação do H_2 , pela nitrogenase, indica uso ineficiente de energia que poderia ser utilizada na fixação do N_2 , além das altas concentrações do H_2 inibirem a atividade da nitrogenase e consequentemente reduz a eficiência da FBN (URETA et al., 2005; RODAK, 2014). Dessa forma, a presença de Ni pode ter favorecido a atividade da hidrogenase, recapturando mais H_2 , aumentando a eficiência energética do processo e consequentemente otimizando a redução do N_2 e todo o processo de FBN.

O método de redução do acetileno (ARA) é amplamente utilizado como uma técnica indireta para mensurar a atividade da nitrogenase (NA_{ase}) em amostras de plantas, bactérias e organismos isolados (BODDEY et al., 2007). Neste estudo, apesar dos resultados de ARA não serem significativos, observou-se uma tendência de resposta com a presença do Ni. A ausência de diferença estatística entre os tratamentos pode ser explicada pela variabilidade dos resultados com um alto coeficiente de variação entre as médias dos tratamentos de aproximadamente 35% (Tabela 2). Todavia, constatou-se que a aplicação de 45 e 90 mg kg⁻¹ de níquel via semente resultou, respectivamente, no aumento de 67% e 77% da atividade da NA_{ase} em relação ao controle. Portanto, muitos fatores podem ter interferido nos resultados desta análise, dentre eles, a temperatura, a quantidade de O₂ no frasco, a concentração de acetileno e o limite de detecção do equipamento, impossibilitando a diferença estatística entre as doses (BODDEY et al., 2007; GUIMARAES et al., 2008).

De maneira geral, a presença de Ni contribuiu significativamente para a FBN na soja e no metabolismo do N, favorecendo o acúmulo de N no grão e na parte aérea. Kutman, Kutman e; Cakmak (2013) relatam aumento de 30% da concentração de N nas folhas novas de plantas de soja com a aplicação externa de Ni. Deve-se considerar também que, no processo de remobilização do N em folhas velhas, ocorre a degradação de proteínas e aminoácidos nas mitocôndrias (e.g., ação da arginase), resultando na formação de ureia no citosol (GERENDAS et al., 1999; WITTE, 2011). O Ni contribui para o aumento da atividade da urease favorecendo o metabolismo do N e aumentando a remobilização do N nas folhas velhas para folhas novas (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013; RODAK, 2014). No processo de FBN, o N₂ é reduzido a NH₃ e posteriormente a NH₄⁺ em função da concentração de íons H⁺ no interior das células bacterianas, sendo transformado nas formas de N-orgânico, principalmente ureídeos (ALVES; BODDEY; URQUIAGA, 2003; CÂMARA, 2014). Grande parte do N é remobilizado na forma de ureídeos em direção à parte aérea, e o Ni pode contribuir significativamente no metabolismo do N de forma direta na atividade da urease e de forma indireta na FBN por meio da atividade da hidrogenase (DIXON et al., 1975; EVANS et al., 1987; KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013).

A presença de Ni influenciou diretamente na atividade da enzima urease que variou de 235 a 580 $\mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, nas doses de 0 e 540 mg kg^{-1} (Figura 6). Foi observado efeito quadrático da atividade da urease, em função dos tratamentos, sendo que a atividade aumentou até a dose de Ni de 180 mg kg^{-1} , com valor máximo de 560 $\mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 6). Nas doses superiores (360 e 540 mg kg^{-1}) não foi possível estimar o valor máximo devido ao limite superior de detecção do equipamento, impossibilitando a quantificação real da atividade enzimáticas nestas doses.

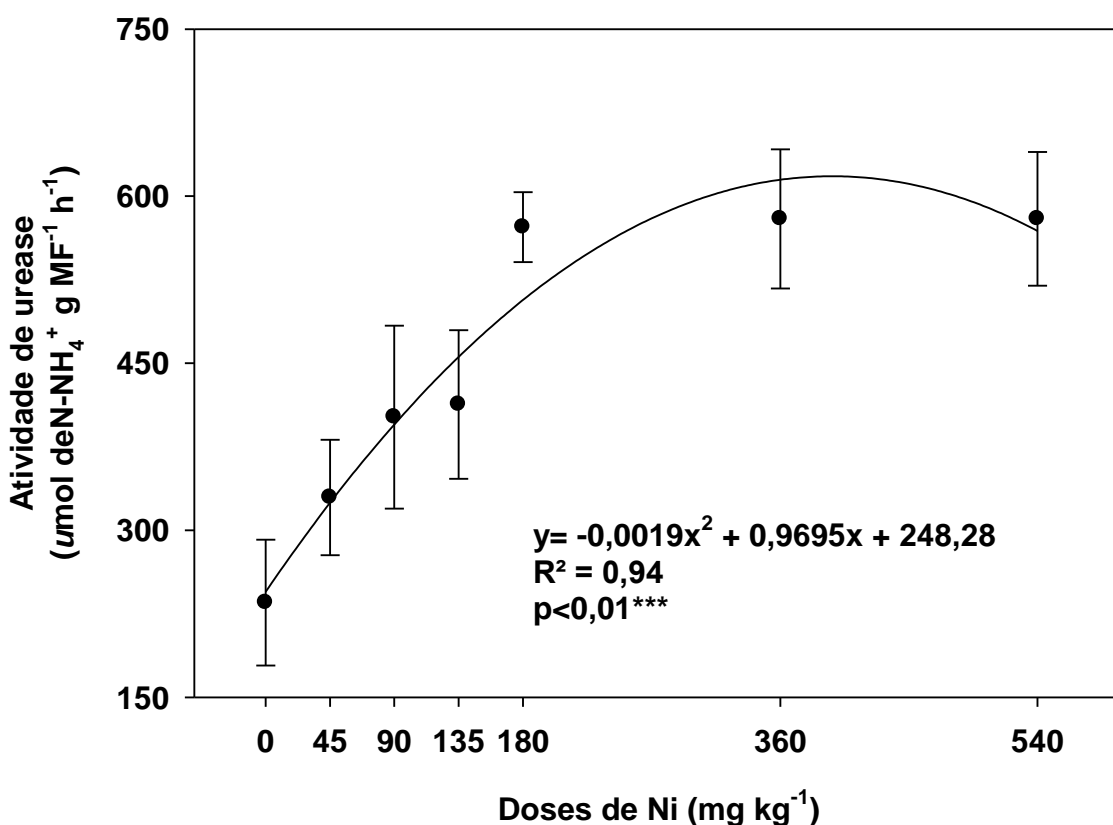


Figura 6- Atividade da enzima urease (coletadas no estágio fenológico R1), das plantas de soja (cultivar BMX Potência), em função de doses de Ni via semente. *, ** e *** indicam efeito significativo de $P \leq 0,1$; 0,05 e 0,001, respectivamente. NS-não significativo. As barras representam o erro padrão médio em relação à média ($n=4$).

4.3 Atividade da enzima da urease

O aumento da atividade enzimática ocorreu porque o Ni é constituinte da urease (DIXON et al., 1975). Resultados semelhantes foram verificados em plantas de soja com sementes enriquecidas com Ni por Kutman, Kutman e Cakmak (2013). Os resultados destes autores mostram que sementes enriquecidas com dose alta de Ni (8,32 mg kg⁻¹) exibem atividades de urease 10X superiores nas sementes com baixo enriquecimento (0,04 mg kg⁻¹). Por sua vez, foi demonstrada também que a atividade da urease variou de 43 a 660 $\mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente para as doses baixa e alta. Por fim, foi constatada que a presença de Ni aumentou a resposta da atividade de urease específica (g por proteína), sendo o efeito semelhante à atividade da urease total (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013). Foi mensurado ainda o efeito da aplicação externa de Ni na atividade da urease e catalase, mas não houve efeito significativo para catalase. Segundo estes autores a aplicação de Ni externa parece favorecer significativamente o efeito da urease, porém sem alterar a concentração de Ni na semente; ou seja, a quantidade absorvida pelo tegumento (KUTMAN; KUTMAN; CAKMAK, 2013). Neste sentido, cabe mencionar que a forma de aplicação do elemento foi diferente daquela realizada no presente trabalho.

O efeito de Ni na atividade da urease é bastante conhecido e já foi relatado por outros pesquisadores. Rodak (2014) observou que a atividade da enzima urease variou de 3,08 a 17,18 $\mu\text{mol N N-NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e de 5,85 a 13, $\mu\text{mol N N-NH}_4^+ \text{ g MF}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, nas plantas cultivadas no solo franco arenoso e muito argiloso, quando submetidas às doses de Ni. Resultados semelhantes também foram verificados em plantas de soja cultivadas em solução nutritiva com o fornecimento de 0,001 a 0,1 mg L⁻¹ de Ni por Klucas et al. (1983). A ureia é um produto originado do metabolismo secundário do N em plantas, principalmente na remobilização, e não pode ser metabolizado por outras rotas (WITTE, 2011). O acúmulo de ureia em condições extremas causa necrose no ápice foliar, interferindo no metabolismo do N. Dessa forma, a presença de concentrações suficientes de Ni é essencial para as plantas, sendo que na condição de baixa disponibilidade ou ausência deste elemento, a planta pode não completar o ciclo de vida (DIXON et al., 1975; GERENDAS et al., 1999; CAKMAK; PFEIFFER; MCCLAFFERTY, 2010).

4.4 Concentração e acúmulo de Ni na semente

As doses de Ni aplicadas na semente influenciaram positivamente a concentração de Ni nos grãos coletados no estágio fenológico R7. Os valores de concentração variaram de 0,3 a 1,1 mg kg⁻¹, respectivamente, para as doses 0 e 540 mg kg⁻¹. Os acúmulos de Ni nos grãos de soja variaram de 1,3 a 4,7 µg por planta, respectivamente, para as doses de 0 e 360 mg kg⁻¹ (Figura 7). As concentrações de Ni nos grãos ajustaram-se ao modelo linear de regressão, exibindo correlação positiva e direta com as doses aplicadas ($R^2 = 0,96^{***}$). Entretanto, para o acúmulo de Ni no grão, o efeito foi quadrático, com correlação positiva para as doses de Ni via semente, em que a dose de 360 mg kg⁻¹ resultou em maior acúmulo de Ni no grão ($R^2 = 0,89^{***}$). Este efeito linear e quadrático, respectivamente, entre a concentração e acúmulo no grão, ocorreu devido a menor produção de massa da parte aérea e produtividade do grão na dose mais elevada de 540 mg kg⁻¹.

Rodak (2014) observou que em plantas cultivadas em solo argiloso, o acúmulo de Ni na planta de soja variou de 3 a 20 µg por planta, enquanto que nas plantas cultivadas no solo franco arenoso variou de 1,3 a 10 µg de Ni por planta. A maior quantidade de Ni acumulada pelas plantas de soja no solo argiloso ocorreu devido à alta disponibilidade no solo, favorecendo o acúmulo. Por sua vez, no solo arenoso, devido ao teor baixo de Ni, resultou em menor acúmulo. Rodak (2014) destaca ainda que a disponibilidade de Ni nos solos está relacionada diretamente as características de cada classe de solo. Porém, a resposta da soja ao Ni depende não somente do teor disponível no solo, mas também das quantidades acumuladas na semente e das condições do ambiente de cultivo (RODAK, 2014).

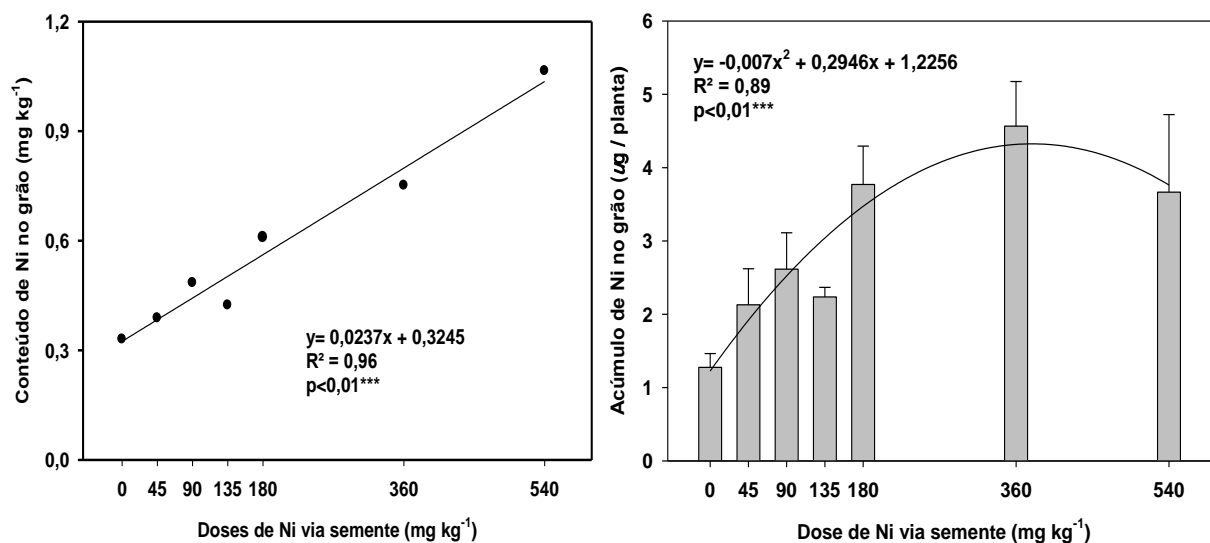


Figura 7- Concentração e acúmulo de Ni no grão (coletadas no estágio fenológico R7), das plantas de soja (cultivar BMX Potência), em função de doses de Ni via semente. *, ** e *** indicam efeito significativo de $P \leq 0,1$; 0,05 e 0,001, respectivamente. NS-não significativo. As barras representam o erro padrão médio em relação à média (n=4).

Neste estudo, a elevada resposta das doses de Ni em relação à concentração e acúmulo de Ni no grão, provavelmente deve-se ao solo arenoso com baixo teor de Ni ($0,03 \text{ mg dm}^{-3}$) e à baixa concentração inicial na semente utilizada no plantio. O Ni apresenta alta mobilidade no floema, e que em estudos realizados com soja foram demonstrados que mais de 70% do Ni presente em folhas senescentes foram remobilizados para o grão (CATALDO et al., 1978). Em trigo efeito semelhante também foi observado, indicando que mais de 75% do ^{63}Ni foi remobilizado de folhas velhas para folha novas (PAGE; FELLER, 2005; RIESEN; FELLER, 2005).

Dessa forma, a aplicação de Ni via semente, favoreceu o processo de absorção deste elemento e remobilização do mesmo da parte aérea para o grão refletindo em elevada concentração e acúmulo de Ni no grão. Em outras pesquisas, concentrações semelhantes aos observados neste estudo foram verificados para grãos por Kutman; Kutman; Cakmak (2013), que obtiveram concentrações de $0,04$ a $8,32 \text{ mg kg}^{-1}$ de Ni, ao estudarem o efeito da aplicação foliar de Ni. Estes autores concluíram que, a concentração de Ni na semente foi incrementada quando houve a aplicação de Ni via folha, sendo observados também valores da

ordem de 2 a 3 vezes quando comparado ao tratamento controle (KUTMAN; KUTMAN; ÇAKMAK, 2013).

A aplicação de Ni via semente, mostrou-se uma alternativa altamente viável e eficiente para o enriquecimento da concentração deste elemento no grão ou na semente, sendo que as doses aplicadas resultaram em elevado acúmulo do nutriente no grão. O tratamento de semente com Ni pode ser indicado como uma forma de aplicação deste elemento em pequenas doses, pois favorece a distribuição e eficiência de aplicação do sulfato de Ni, fonte utilizada neste estudo. A aplicação de Ni via semente deve ser considerada principalmente em solos com baixos teores, onde a resposta da planta ao elemento é maior (RODAK, 2014). Deve-se salientar mais uma vez que o conteúdo de Ni na semente também deverá ser considerado, sendo o efeito maior quando a concentração de Ni na semente for baixa (KUTMAN; KUTMAN; ÇAKMAK, 2013).

4.5 Produção de massa seca da parte aérea, produção de grãos, índice de colheita e massa seca de nódulos

Foi constatada diferença na produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e na produção de grãos (PG) em função das doses de Ni aplicada via semente (Figura 8). A MSPA variou de aproximadamente 6,6 a 10,8 g/planta, respectivamente, para as doses de Ni de 0 e 180 mg kg⁻¹. A produção de massa seca de grãos variou de 3,8 a 6,2 g/planta, respectivamente, para as doses de Ni de 0 e 180 mg kg⁻¹. Em ambas as variáveis estudadas, observou-se efeito quadrático das doses de Ni aplicadas, sendo que a dose mais elevada resultou em decréscimo de produtividade de grãos e MSPA. Segundo Gerendas et al. (1999) em doses elevadas o Ni pode atuar como metal pesado, portanto a redução destes parâmetros avaliados provavelmente está relacionada ao seu efeito tóxico. Os sintomas de toxidez se desenvolvem quando quantidades excessivas são absorvidas, sendo os sintomas caracterizados por clorose, provavelmente devido a menor absorção de Fe, e crescimento reduzido das raízes e parte aérea (WOOD; REILLY, 2007). Em estudo recente de Rodak (2014), plantas de soja submetidas às doses de Ni de 5 mg dm⁻³ apresentaram sintomas de toxidez nas folhas. O efeito de toxidez foi destacado em solo argiloso, no qual foi verificado menor desenvolvimento das plantas. O mesmo efeito foi observado neste experimento, pelo qual foi possível observar crescimento

reduzido das plantas, menor produção de MSPA e menor produção de grãos nas doses elevadas (Figura 8).

As doses de Ni influenciaram positivamente o índice de colheita da soja. Observou-se que nas doses de Ni de 45 e 90 mg kg⁻¹ que ocorreram os valores mais elevados de índice de colheita, enquanto que em doses maiores, como por exemplo na dose de 540 mg kg⁻¹ houve redução no índice, provavelmente devido ao efeito deletério de toxidez do Ni (Figura 8). Em relação à massa de nódulo, embora não houve diferenciação para as doses de Ni, observou-se que houve uma tendência de aumento de massa de nódulo para as doses de Ni. O maior valor de massa de nódulo foi observado para a dose de 45 mg kg⁻¹, mesma dose que favoreceu o aumento da contribuição do % de FBN (Tabela 2).

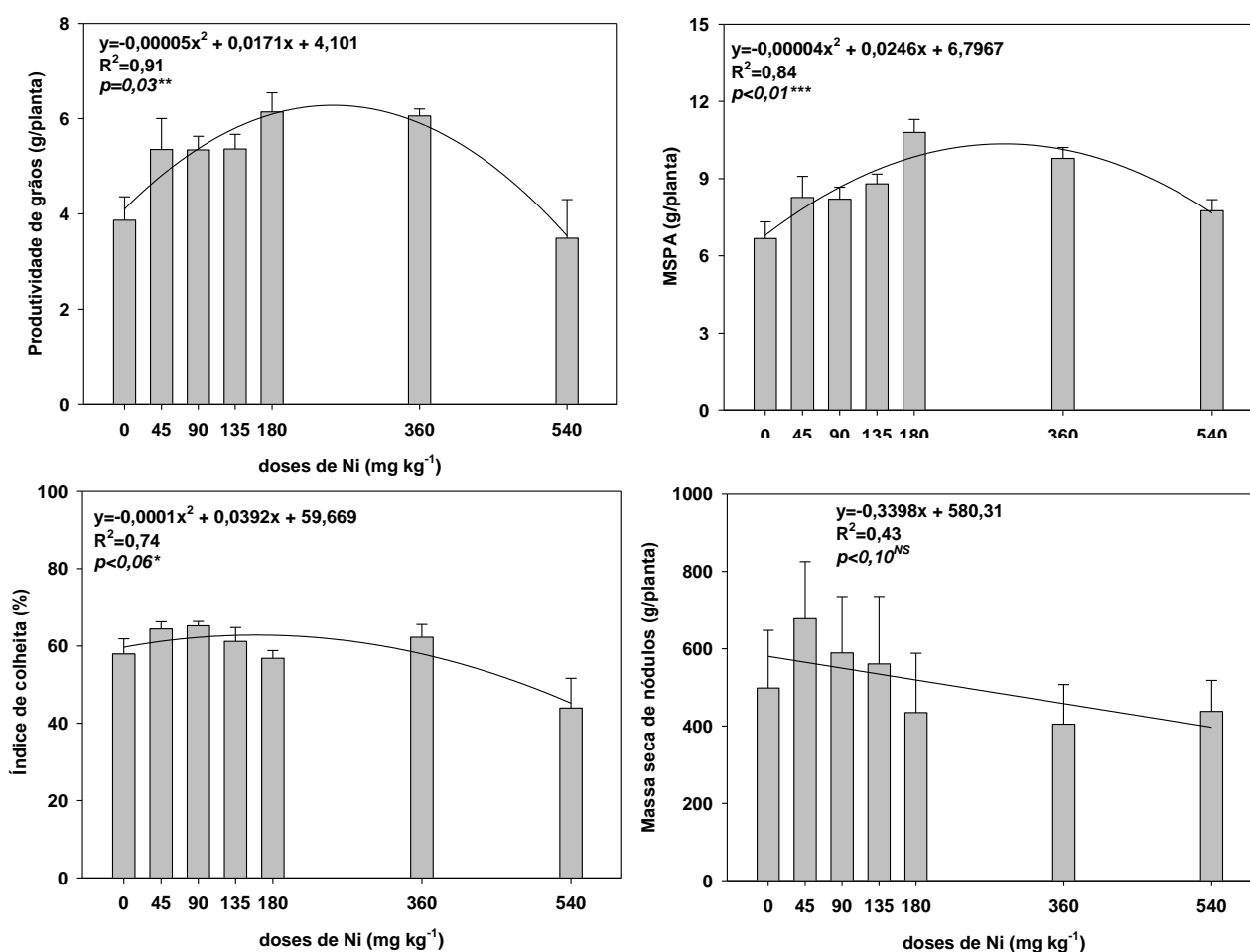


Figura 8- Produtividade de grãos (PG), massa seca de parte aérea (MSPA), índice de colheita (IC) em plantas (coletadas no estágio fenológico R7) e massa seca de nódulos (MSN) em plantas (coletadas no estágio fenológico R1) de soja (cultivar BMX Potência), em função de doses de Ni via semente. *, ** e *** indicam efeito significativo de $P \leq 0,1$; 0,05 e 0,001, respectivamente. NS-não significativo. As barras representam o erro padrão médio em relação à média (n=4)

São escassos os trabalhos sobre o fornecimento de níquel aplicado via semente. A grande maioria dos trabalhos relata a adição deste elemento no solo (RODAK, 2014), em solução nutritiva (KUTMAN; KUTMAN; ÇAKMAK, 2013) ou aplicação foliar (NYCZEPIR; WOOD, 2012) ou mesmo já consideraram que a quantidade de Ni existente no solo e na semente já é suficiente para suprir a demanda da planta (RODAK, 2014). Kutman, Kutman e Çakmak (2013) observaram que a aplicação deste micronutriente na semente não promoveu acréscimos na produtividade de soja, embora influenciasse na atividade de algumas enzimas analisadas.

No presente trabalho, os resultados mostram que nas menores doses de Ni aplicadas na semente, obteve-se incremento na produção de grãos por planta. Como mostrado em resultados anteriores, o níquel influenciou na atividade de enzimas que participam do metabolismo do N, bem como promoveu uma maior fixação biológica de N, além de maior acúmulo de N pelas plantas. A atuação direta do Ni no metabolismo do N propiciou uma maior oferta de N para a planta de soja, haja vista a alta demanda deste nutriente pela soja, e sua falta é um dos principais limitantes a altas produtividade de cultivos de soja. Bertrand (1973), em experimentos de campo, com a adição de até $0,02 \text{ mg dm}^{-3}$ de Ni, verificou incremento de produtividade nesta mesma espécie. Na maior dose de Ni estudada, este autor relatou efeito negativo nos parâmetros avaliados, bem como redução na produtividade de soja, sendo que este fato se deve a uma possível toxidez do elemento no metabolismo vegetal (GERENDAS et al., 1999; MALAVOLTA, 2006).

De forma geral, a presença do Ni no tratamento de semente estimulou o processo de FBN, provavelmente devido à maior atividade da enzima hidrogenase, a qual este elemento é constituinte (DIXON et al., 1985). Certamente, quando houve aumento da atividade da hidrogenase – confirmada indiretamente pela determinação da atividade da nitrogenase (por meio da técnica indireta da redução do acetileno), aumentou a eficiência do processo energético de FBN, reduzindo o custo de carbono e de fotoassimilados para a bactéria (KASCHUK et al., 2012; LUCA et al., 2014). O aumento da contribuição da FBN refletiu em maior acúmulo de N-total na parte aérea e nos grãos e com aumento da atividade da urease, sendo estes benefícios aliados à economia de fotoassimilados resultaram em incremento de produção de MSPA e produção de grãos.

Por fim, a aplicação de Ni via semente deve ser adotado, principalmente em solos arenosos com baixos teores deste elemento e em solos de textura média e arenosa após a correção com calcário. A aplicação do Ni, no tratamento de semente, é uma estratégia viável, pois pode ser realizada com os outros dois micronutrientes essenciais no processo de FBN, Mo e Co. Neste estudo ficou evidente a contribuição do Ni no processo de FBN e aumento de produção de grãos. No entanto, são necessários outros estudos, em condições controladas e de campo, avaliando diferentes genótipos, tipos de solos e diferentes teores de Ni na semente.

5-CONCLUSÃO

A aplicação de Níquel (Ni) via semente aumenta a fixação biológica de nitrogênio na soja e favorece o acúmulo de Ni e N-total no grão, com aumento da atividade da urease.

A aplicação de doses baixas de Ni (45 e 90 mg kg⁻¹) via semente proporciona aumento de massa seca de parte aérea, da massa seca de nódulos e da produção de grãos de soja. O tratamento de semente de soja com Ni tem efeito positivo no metabolismo do N e eleva os teores de clorofila (em unidades SPAD) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Doses elevadas de Ni resultaram em menor produção de massa seca da parte aérea e menor produção de grãos, sendo sugerida dose de Ni de 45 a 90 mg kg⁻¹ de semente o que equivale de 2,5 a 5,0 gramas de Ni por hectare.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, S. L.; MAIER, R. J.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A.; D. W. EMERICH, D. W.; EVANS, H. J. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. **Science**, Washington, DC, v. 203, p. 1255-1257, 1979.
- 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.
- ANGHINONI, I. Fertilidade do solo e seu manejo em sistema plantio direto. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V.; BARROS, V. H.; FONTES, N. F. de; CANTARUTTI, R. L. F.; NEVES, R. B.; J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 873-928.
- ARNON, D. I.; STOUT, P. R. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to cooper. **Plant Physiology**, Rockville, v. 14, p. 371-375, 1939.
- BAGINSKY, C.; BRITO, B.; IMPERIAL, J.; PALACIOS, J. M.; ARGUESO, T. R. Diversity and evolution of hydrogenase systems in rhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 68, p. 4915–4924, 2002.
- BAI, C.; REILLY, C. C.; WOOD, B. W. Nickel deficiency disrupts metabolism of ureides, amino acids, and organic acids of young pecan foliage. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 433-443, 2006.
- BARRON, A. R.; WURZBURGER, N.; BELLENGER, J. P.; WRIGHT, S. J.; KRAEPIEL, A. M. L.; HEDIN, L. O. Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. **Nature Geoscience**, London, v. 2, p. 42-45, 2009.
- BERTRAND, D. Importance du nickel, comme oligo-élément, pour les Rhizobium des nodosités des légumineuses. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L' Academie des Sciences**, Paris, v. 276, p.1855-1858, 1973.
- 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.
- BRITO, M. M. P.; MURAOKA, T.; SILVA, E. S. Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) walp.) e feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada com uso de ¹⁵N. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 895-905, 2009.
- BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z.; ZHAO, F. Function of nutrients: micronutrients. In: MARCHNER, H. (Ed.). **Mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

BROWN, P. H.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: a micronutrient essential for all higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 801-803, 1987.

CAKMAK, I.; PFEIFFER, W. H.; MCCLAFFERTY B. Biofortification of durum wheat with zinc and iron. **Cereal Chemistry**, St. Paul, v. 87, p.10-20, 2010

CAIRES, E. F.; JORIS, H. A. W.; CHURKA, S. Long-term effects of lime and gypsum additions on no-till corn and soybean yield and soil chemical properties in southern Brazil. **Soil Use and Management**, Hoboken, v. 27, p. 45-53, 2011.

CÂMARA, G. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em soja. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 147, p. 1-9, 2014.

CANTARELLA, H.; RAIJ, B. Van; QUAGGIO, J. A. Soil and plant analyses for lime and fertilizer recommendations in Brazil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 29, p. 1691-1706, 1998.

CARPENA, R.; ESTEBAN, E.; SARRO, M.; PENALOSA, J., GÁRATE, A.; LUCENA, J.; ZORNOZA, P. Boron and calcium distribution in nitrogen-fixing pea plants. **Plant Science**, Amsterdam v. 151, p. 163-170, 2000.

CATALDO, D. A.; GARLAND, T. R.; WILDUNG, R. E. Nickel in plants: II. Distribution and chemical form in soybean plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 62, p. 566-570, 1978.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos - Safra 2013/14. **Décimo Segundo Levantamento**, Brasília, DF, v. 1, n. 12, p. 1-127, 2014.

COOPER, J.; SCHERER, H. Nitrogen fixation. In: MARCHNER, H. (Ed.). **Mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. Amsterdam: Elsevier, 2012.

DIXON, N. E.; GAZZOLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). A metalloenzyme. A simple biological role for nickel. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 97, p. 4131-4133, 1975.

EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja**. Região Central do Brasil 2012 e 2013. Londrina: Embrapa Soja, 2011.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; CARY, E. E. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. **Science**, Washington, DC, v. 222, p. 621-623, 1983.

ESKEW, D. L.; WELCH, R. M.; NORVELL, W. A. Nickel in higher plants: further evidence for an essential role. **Plant Physiology**, Rockville, v. 76, p. 691-693, 1984.

EVANS, H. J.; HARKER, A. R.; PAPEN, H.; RUSSELL, S. A.; HANUS, F. J.; ZUBER, M. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 335-361, 1987.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GERENDAS, J.; SATTELMACHER, B. Significance of Ni supply for growth, urease activity and the concentrations of urea, amino acids and mineral nutrients of urea-grown plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 190, p. 153-162, 1997.

GERENDAS, J.; POLACCO, J. C.; FREYERMUTH, S. K. A.; SATTELMACHER, B. Significance of nickel for plant growth and metabolism. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Hoboken, v. 162, p. 241–256, 1999.

GUIMARÃES, A. P.; MORAIS, R. F.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. *Bradyrhizobium* strain and the ¹⁵N natural abundance quantification of biological N₂ fixation in soybean, **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, n. 5, p. 516-524; 2008

HATFIELD, J. L.; EGLI, D. B.; LEGGETT, J. E.; PEASLEE, D. E. Effect of applied nitrogen on the nodulation and early growth of soybeans (*Glycine max* (L) MERR.), **Agronomy Journal**, Madison, v. 66, p. 112 -114, 1974.

HOGAN, M. E.; SWIFT, I. E., DONE, J. Urease assay and ammonia release from leaf tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v. 22, p. 663-667, 1983.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.; CAMPO, R.; CRISPINO, C.; MORAES, J.; SIBALDELLI, R.; MENDES, I.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N₂ fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v. 86; p. 927–939, 2006.

ISO. **ISO 16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp). Determination of effects or reproduction and survival. Genebra, 2003.

JESUS, S. V.; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternative para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 815-818, 2008.

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 & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1233-1244, 2009.

KASCHUK, G.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. E.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M.; KUYPER, T. W. Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 42, p. 125-127, 2010.

KASCHUK, G.; YIN, X.; HUNGRIA, M.; LEFFELAAR, P. A.; GILLER, K. E.; KUYPER, T. W. Photosynthetic adaptation of soybean due to varying effectiveness of N₂ fixation by two distinct *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Environmental Experimental Botany**, Oxford v. 76, p. 1–6, 2012.

KLUCAS, R. V.; HANUS, F. J.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Nickel: A micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 80, p. 2253-2257, 1983.

KOCHIAN, L. V. Mechanisms of micronutrient uptake and translocation in plants. In: MORTVEDT, J.J. (Ed.). **Micronutrients in agriculture**. Madison: SSSA, 1991. p. 251-270.

KUTMAN, B. Y.; KUTMAN, U. B.; ÇAKMAK, I. Nickel-enriched seed and externally supplied nickel improve growth and alleviate foliar urea damage in soybean, **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 363, p. 61-75, 2013.

LAVRES JUNIOR, J.; SANTOS JUNIOR, J. D. G.; MONTEIRO, F. A. Nitrate reductase activity and SPAD readings in leaf tissues of Guinea grass submitted to nitrogen and potassium rates. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 801-809, 2010.

LEDGARD, S. F.; FRENEY, J. R.; SIMPSON, J. R. Variations in natural enrichment of ¹⁵N in the profiles of some Australian Pasture Soils. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v. 22, p. 155-64, 1984.

LOPES, A. S.; WIETHÖLTER, S.; GUILHERME, L. R. G.; SILVA, C. A. **Sistema plantio direto**: bases para o manejo da fertilidade do solo. São Paulo: ANDA, 2004. 115 p. Disponível em: <http://www.anda.org.br/multimedia/lt_spd.pdf>. Acesso em: 30 out. 2014.

LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G. Fertilidade do solo e produtividade agrícola. In: NOVAIS, R. F. de; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F. de; FONTES, R. L.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. v. 1, p. 1-64.

LUCA, M. J.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Feasibility of lowering soybean planting density without compromising nitrogen fixation and yield. **Agronomy Journal**, Madison, v. 106, p. 2118-2124, 2014.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas**. Princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2006. .

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

MINOLTA CAMERA Co. **Manual for chlorophyll meter Spad-502**. Osaka, 1989. 22 p.

NEVES, M. C. P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **Critical Reviews in Plant Science**, London, v. 6, p. 267-321, 1987.

NYCZEPIR, A. P.; WOOD, B. W. Foliar nickel application can increase the incidence of peach tree short life and consequent peach tree mortality. **HortScience**, Alexandria, v. 47, p. 224–227, 2012.

OLIVEIRA JUNIOR, A.; CASTRO, C.; KLEPKER, D.; OLIVEIRA, F. A. Soja. In: PROCHNOW, L. I.; CASARIN, V.; STIPP, S. R. (Org.). **Boas práticas para o uso eficiente de fertilizantes**. Piracicaba: IPNI, 2010. v. 3, p. 1-38.

PAGE, V.; FELLER, U. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, p. 425–434, 2005.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O.; FERNANDES, A. R.; MIRANDA, J. R. P. Efeito da aplicação de doses crescentes de níquel sobre o teor e o conteúdo de nutrientes em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart) Standley). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 63, p. 158-166, 2003.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989. 76 p. (ACIAR Monograph, 11).

PEREIRA, J. M. N. **Doses de Cd, Pb, Cu, Zn e Ni em latossolos**: efeitos no solo e nas plantas de alface e feijão. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

POLACCO, J. C. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. I. Assimilation of urea. **Plant Physiology**, Rockville, v. 58, p. 350-357, 1976.

POLACCO, J. C. Nitrogen metabolism in soybean tissue culture. II. Urea utilization and urease synthesis require Ni²⁺. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 827-830, 1977.

QUAGGIO, J. A.; RAIJ, B. Van; MALAVOLTA, E. Alternative use of SMP buffer solution to determine lime requirement of soils. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 16, p. 245-260, 1985.

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (Ed.) **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001.

REIS, V. M.; OLIVEIRA, A. L. M. de; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I. Fixação biológica de nitrogênio simbiótica e associativa. In: FERNANDES, M. S. (Org.). **Nutrição mineral de plantas**. 1. ed. Viçosa: SBCS, 2006. v. 1, p. 153-174.

REIS, A. R.; RODAK, B. W.; PUTTI, F. F.; MORAES, M. F. Papel fisiológico do níquel: essencialidade e toxidez em plantas. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 147, p. 10-24, 2014.

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. 20 p. (Special Report, 53).

RIESEN, O.; FELLER, U. Redistribution of nickel, cobalt, manganese, zinc, and cadmium via the phloem in young and maturing wheat. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 28, p. 421-430, 2007.

RODAK, B. W.; **Níquel em solos e na cultura de soja**. 2014. 88 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SAS Institute. **The SAS system for windows**. v. 9.2. Cary, NC. 2009.

SHEARER, G.; KOHL, D. H. N₂ fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal Plant Physiology**, Melbourne, v. 13, p. 699-756, 1986.

SHIMADA, N.; ANDO, T. Role of nickel in plant nutrition. II. Effect of nickel on the assimilation of urea by plants. **Japanese Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 51, p. 493-496, 1980.

TRIVELIN, P. C. O.; SALATI, E.; MATSUI, E.; SAITO, S. M. T.; LIBARDI, P. L. Medida da fixação do nitrogênio atmosférico em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cv Carioca, empregando-se o método com nitrogênio-15 a baixo enriquecimento. **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v. 6, n. 1, p. 55-74, 1984.

UNKOVICH, M.; HERRIDGE, D.; PEOPLES, M.; CADISCH, G.; BODDEY, R.; GILLER, K.; ALVES, B.; CHALK, P. **Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems**. Canberra: ACIAR, 2008. (ACIAR Monograph, 136).

URETA, A. C.; IMPERIAL, J.; ARGUESO, T.; PALACIOS, J. M. *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae Symbiotic Hydrogenase Activity and Processing Are Limited by the Level of Nickel in Agricultural Soils **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 71, p. 7603–7606, 2005.

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. DE; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; MAIA E SÁ, J.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S. DE; 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.

VITTI, G. C.; TREVISAN, W. Manejo de macro e micronutrientes para alta produtividade de soja. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, 2000. 16 p. (Encarte Técnico, 90).

WITTE, C. P. Urea metabolism in plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 180, p.431-438, 2011

WOOD, B. W.; REILLY, C. C. Nickel and plant disease. In: DATNOFF, L. E.; ELMER, W. H.; HUBER, D. M. **Mineral nutrition and plant disease**. St. Paul: APS Press, 2007. chap. 16, p. 215-219.

WOOD, B. W.; REILLY, C. C.; NYCZEPIR, A.P. Mouse-ear of pecan: I Symptomlogy and occurrence. **HortScience**, Alexandria, v. 38, p. 87-94, 2004a.

WOOD, B. W.; REILLY, C. C.; NYCZEPIR, A. P. Mouse-ear of pecan: II Influence of nutrient applications. **HortScience**, Alexandria, v. 38, p. 95-100, 2004b.