

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

DISSERTAÇÃO

Absorção de Nitrato e Amônio em Genótipos
Contrastantes de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp.)
Inoculados ou não Bactérias Diazotróficas

Danilo Augusto Silvestre

2017

Seropédica, RJ
Setembro de 2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**Absorção de Nitrato e Amônio em Genótipos
Contrastantes de Cana-de-Açúcar (*Saccharum* spp.)
Inoculados ou não Bactérias Diazotróficas**

DANILO AUGUSTO SILVESTRE

Sob a Orientação do Professor
Leandro Azevedo Santos

e Co-orientação do Professor
Veronica Massena Reis

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

DANILO AUGUSTO SILVESTRE

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo).

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/02/2017

Leandro Azevedo Santos. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Fabio Lopes Olivares. Dr.UENF

Marco Andre Alves de Souza. Dr.UFRRJ

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado força, sabedoria e tranquilidade para que eu chegasse ao final dessa caminhada com sucesso; por ter me guiado e me protegido todos os dias.

Ao Prof. Leandro Azevedo Santos pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, pela oportunidade de trabalhar em sua equipe de pesquisa e pela amizade.

À Veronica Massena Reis pela orientação, pelo suporte e confiança nesses dois anos de mestrado.

À Profa. Sonia Regina de Souza, pela dedicação e pelo compartilhamento de seus conhecimentos.

Ao Prof. Manlio Fernandes Silvestre, pelo compartilhamento de suas experiências e conhecimentos.

Ao Willian Pereira pela amizade e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Nutrição de Plantas: Carla Patrícia, Marcela Jacques, Sabrina Dahmer, Leilson Arruda, Rafael Rangel, Marcus Sperandio, Leandro Martins, Juan Sebastián e Renan Braga.

À equipe do Laboratório de Gramíneas da Embrapa Agrobiologia: Silvana Santos, Mayan Blanc, Gabriela Alves, Natalia, Julia Xavier, Cecília Cotrim, Sara Miranda, Lorraine, Tamires, Farley Breda, Alison Rocha, Otavio Queiroz, Wilson Cabral e Lucio Gomes.

Aos funcionários da Embrapa Agrobiologia pela colaboração e suporte.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

Ao Programa de Pós-Graduação – Ciência do Solo pela oportunidade de realização do meu Mestrado.

Ao Laboratório de Nutrição de Plantas, pelo suporte na realização das análises.

À Embrapa Agrobiologia, pela infraestrutura para implantação dos experimentos.

Aos Professores do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (IA-UFRRJ)

À Embrapa Agrobiologia por contribuírem com a minha formação.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida durante o mestrado.

RESUMO

SILVESTRE, Danilo Augusto. **Absorção de nitrato e amônio em genótipos contrastantes de cana-de-açúcar (*saccharum spp*) inoculados ou não com bactérias diazotróficas** 2017. 63f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Devido à constante expansão da cultura de cana-de-açúcar (*saccharum spp*) para solos marginais, houve a necessidade de aumentar as doses de fertilizantes para manutenção da produtividade. A adubação nitrogenada na maioria dos países produtores se baseia em aplicações de doses elevadas. No Brasil, as variedades foram selecionadas e indicadas para solos de diferentes classes de fertilidade podendo então diferir quanto a eficiência de aquisição de N. Paralelo as possíveis diferenças de eficiência de uso de N entre as variedades, há evidências do incremento do conteúdo de N nas plantas de cana-de-açúcar via promoção de crescimento pelas bactérias diazotróficas. Estudos prévios demonstraram que as bactérias diazotróficas podem alterar a expressão de genes do metabolismo de N e alguns transportadores desse nutriente, favorecendo a eficiência do uso de N (EUN) pelas plantas. Para compreender as causas fisiológicas da baixa EUN em cana-de-açúcar, realizaram-se dois estudos: o primeiro foi com diferentes proporções de $\text{N-NO}_3^-/\text{N-NH}_4^+$, em duas variedades contrastantes quanto a classe fertilidade indicada para o seu cultivo, com objetivo de verificar os efeitos do nitrato e amônio e suas combinações, no acúmulo de biomassa, no crescimento, nas frações nitrogenadas e na atividade de enzimas do metabolismo de N. Plantas das variedades 'RB867515' e 'IACSP-95 5000' foram crescidas em cinco proporções de $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ (100 / 0 ; 75 / 100 ; 50 / 50 ; 25 / 100 ; 0 / 100), na concentração total de 3,0 mM de N. A variedade 'RB867515' apresentou maior incremento de biomassa seca. As proporções de nitrato e amônio não influenciaram o crescimento e desenvolvimento das variedades. Na parte aérea, a 'IACSP95-5000' acumulou mais nitrato e apresentou maior atividade da NR. As variedades apresentaram maiores acúmulo de amônio e N-amino em raízes. O segundo estudo foi realizado a fim verificar o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas no conteúdo de N em raízes de cana-de-açúcar. As plantas foram submetidas à solução nutritiva com diferentes concentração de ^{15}N (amônio e nitrato) por curto período de tempo a fim de evitar a regulação da absorção desse nutriente por feedback. Observou-se um maior acúmulo de N nas raízes da variedade IACSP95-5000 sob nutrição nítrica e na RB867515 sob nutrição amoniacal.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; Nitrato; Amônio; Eficiência no uso de N (EUN); Bactérias diazotróficas.

ABSTRACT

SILVESTRE, Danilo Augusto. **Nitrate and ammonium uptake in contrasting sugarcane (*saccharum* spp.) genotypes inoculated or no with diazotrophs.** 2000.48f. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2000.

Due to the constant expansion of the sugarcane crop (*saccharum* spp) to marginal soils, there was a need to increase fertilizer doses to maintain productivity. Nitrogen fertilization in most producing countries is based on high dose applications. In Brazil, the varieties were selected and indicated for soils of different fertility classes, and it is possible to differ in the nitrogen uptake efficiency. The acquisition the possible differences nitrogen use efficiency of among the varieties, there is evidence that N content increase in the sugarcane plants growth promotion by diazotrophic bacteria. However, molecular and physiological studies indicate that diazotrophic bacteria in association with sugarcane can increase the gene expression responsible for the process of nitrate and ammonium transport in the plant. To understand the physiological causes of low EUN in sugarcane, two studies were carried out: the first , was with different proportions of $\text{N-NO}_3^- / \text{N-NH}_4^+$, in two contrasting varieties regarding the fertility class indicated for its cultivation, with the objective of verifying the effects of nitrate and ammonium and their combinations, in the accumulation of biomass, in the growth, in the nitrogen fractions and in the activity of enzymes of the metabolism of N. Plants of varieties 'RB867515' and 'IACSP95-5000' were grown in five proportions of $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ (100/0; 75/100; 50/50; 25/100; 0/100), total concentration of 3,0 mM N. The 'RB867515' dry biomass increase. The proportions of nitrate and ammonium did not influence the growth and development of the varieties. In the aerial part, 'IACSP95-5000' accumulated more nitrate and presented higher NR activity. The varieties showed higher accumulation of ammonium and N-amino in roots. The second study was carried out to verify the effect of inoculation with diazotrophic bacteria on N content in sugarcane roots. The plants were submitted to nutrient solution with different concentration of ^{15}N (ammonium and nitrate) for a short period of time in order to avoid the regulation of the uptake nutrient by feedback. A higher accumulation of N was observed in roots of the variety 'IACSP95-5000' under nitric nutrition and in 'RB867515' under ammoniacal nutrition.

Key words: Sugarcane contrasting varieties. Nitrate. Ammonium. Nitrogen use efficiency (NUE). Diazotrophs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Importância da Cana-de-Açúcar.....	2
2.2 Absorção de nitrato e amônio.....	3
2.3 Eficiência no Uso de Nitrogênio em Cana-de-açúcar (Absorção, Remobilização, Assimilação).....	5
2.4 Transportadores de nitrato e amônio	7
2.5 Cinética de absorção de nitrato e amônio.....	8
2.6 Bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar: FBN e promoção de crescimento	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Efeito de diferentes proporções de nitrato e amônio em variedades contrastantes de cana-de-açúcar– Experimento I	12
3.1.1 Condições experimentais	12
3.1.2 Variedades	12
3.1.3 Tratamentos e delineamento experimental	13
3.1.4 Biomassa seca de raiz, colmo e folha	13
3.1.5 Avaliações biométricas	13
3.1.6 Conteúdo relativo de clorofila	14
3.1.7 Atividade da nitrato redutase	14
3.2 Frações solúveis	14
3.2.1 Dosagem de $N-NO_3^-$	15
3.2.2 Dosagem de $N-NH_4^+$	15
3.2.3 Dosagem de açúcares solúveis.....	15
3.2.4 Dosagem de N-amino livre	16
3.2.5 N-total	17
3.3 Absorção de nitrogênio em variedades contrastantes de cana-de-açúcar inculadas ou não com bactérias diazotróficas – Experimento II.....	17
3.3.1 Preparo do Inoculante	17
3.3.2 Tratamentos e delineamento experimental	19
3.3.3 Análises estatística	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Efeito de diferentes proporções de nitrato e amônio no crescimento e no acúmulo de biomassa seca em cana-de-açúcar	21
4.1.1 Acúmulo de biomassa.....	21
4.1.2 Dados biométricos	23
4.2 Características quantitativas da raiz e parte aérea das plantas	26
4.2.1 Frações nitrogenadas.....	26
4.2.2 Teores de nitrato	26
4.2.3 Teores de amônio.....	27
4.2.4 Teores de açúcares solúveis	29
4.2.5 Teores de N-amino.....	31
4.2.6 Atividade da Nitrato redutase	33
4.2.7 Concentração total de N.....	36

4.3	Absorção de nitrogênio em variedades contrastantes de cana-de-açúcar inculadas ou não com bactérias diazotróficas – Experimento II.....	38
4.3.1	Absorção de nitrato e amônio	38
5.	CONCLUSÕES.....	43
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
8.	ANEXOS.....	54

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura agrícola de grande importância econômica para o Brasil, sendo utilizada para a produção de açúcar e etanol combustível. A área cultivada com cana-de-açúcar no Brasil hoje é de 8.995,5 mil ha. São Paulo, maior produtor, possui 52% (4.678,7 mil ha), seguido por Goiás com 10,1% (908 mil ha), Minas Gerais com 9% (811,2 mil ha), Mato Grosso do Sul com 7,5% (677,9 mil ha), Paraná com 6,6% (596 mil ha), Alagoas com 3,8% (338,3 mil ha), Pernambuco com 2,9% (264 mil ha) e Mato Grosso com 2,6% (230,3 mil ha). Estes oito estados são responsáveis por 94,5% da produção nacional. Os outros 14 estados produtores possuem áreas menores, totalizando 5,5% (CONAB, 2016).

A área cultivada com cana-de-açúcar encontra-se em expansão no Brasil, no entanto o uso de fertilizantes nitrogenadas pela cultura é relativamente baixo ($60-100 \text{ kg ha}^{-1}$), quando comparado a outros países grandes produtores, como China ($100-755 \text{ kg ha}^{-1}$) e Índia ($150-400 \text{ kg ha}^{-1}$) (ROBINSON et., 2011; SOUZA, 2005).

A resposta da cana-de-açúcar a aplicação de fertilizantes nitrogenados é baixa quando comparado a outras plantas cultivadas (ROBINSON et. al., 2011). A baixa eficiência de utilização do N-fertilizante (EUNF) tem sido atribuída à fixação biológica do N atmosférico; às perdas por lixiviação de N-fertilizante; às condições climáticas como temperatura e pluviosidade; à melhoria da fertilidade do solo após a reforma dos canaviais associada à calagem, ao preparo mecânico e à incorporação de restos da cultura anterior e processo de nitrificação (URQUIAGA et al., 1992; ORLANDO FILHO et al., 1999 ; ROBINSON et., 2011).

A descoberta de alternativas para a nutrição nitrogenada e promoção de crescimento em plantas de cana-de-açúcar podem representar ganhos de produtividades de forma sustentável. Uma das alternativas é a aplicação de bactérias capazes de promover o crescimento vegetal através de mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a produção de fitormônios (PEREIRA, 2011).

Considerando a importância quantitativa do N na nutrição mineral das plantas, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são conhecidas por desencadear benefícios tanto na nutrição das plantas quanto no desenvolvimento radicular. Os efeitos positivos das BPCP sobre o crescimento das plantas correlacionam com as mudanças notáveis na morfologia radicular, aumentando tanto o comprimento de raízes laterais, quanto o número pelos radiculares, resultando em melhorias na captação de água e nutrientes do solo (TOURAINÉ et al., 2003).

O objetivo do presente trabalho foi verificar o desempenho de variedades contrastantes de cana-de-açúcar quando submetidas ao fornecimento de diferentes proporções de nitrato e amônio. Também avaliamos a cinética de influxo de $^{15}\text{N-NO}_3^-$ e $^{15}\text{N-NH}_4^+$ nas raízes das duas variedades, inoculadas ou não com bactérias diazotróficas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da Cana-de-Açúcar

Introduzida no período colonial, a cana-de-açúcar se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira. O Brasil não é apenas o maior produtor de cana, seguido por Índia e China. É também o primeiro do mundo na produção de açúcar e etanol, e conquista, cada vez mais, o mercado externo inserindo o biocombustível como alternativa energética (MAPA, 2016).

A cana-de-açúcar é talvez, o único produto de origem agrícola destinado à alimentação que ao longo dos séculos foi alvo de disputas e conquistas, mobilizando homens e nações. A planta que dá origem a diferentes produtos encontrou lugar ideal no Brasil devido às boas condições de clima e solo. Durante o Império, o país dependeu basicamente do cultivo da cana e da exportação do açúcar. Calcula-se que naquele período da história, a exportação do açúcar rendeu ao Brasil cinco vezes mais que as divisas proporcionadas por todos os outros produtos agrícolas destinados ao mercado externo (UDOP, 2016).

O cenário da cultura atualmente é promissor, a área cultivada com cana-de-açúcar que deverá ser colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2015/16 é de 9.070,4 mil hectares, distribuídas em todos estados produtores. O Estado de São Paulo permanece como o maior produtor com 51,7% (4.687,6 mil hectares) da área plantada, seguido por Goiás com 9,8% (891,6 mil hectares), Minas Gerais com 8,9% (808 mil hectares), Mato Grosso do Sul com 7,5% (682,3 mil hectares), Paraná com 6,8% (620,1 mil hectares), Alagoas com 4,3% (386 mil hectares) e Pernambuco com 3% (276,3 mil hectares). Estes sete estados são responsáveis por 92,1% da produção nacional. Os outros dezesseis estados produtores possuem áreas menores, com representações abaixo de 2,5%, totalizando 8% da área total do país (CONAB, 2015).

A cadeia de produção de cana de açúcar é uns dos principais setores do agronegócio, a qual incorporou área de outras lavouras, principalmente, pastagens (CAMARGO et al., 2008). Entre as principais culturas geradoras de renda e emprego a cana de açúcar tem destaque no cenário nacional (ARALDI, 2010). Em razão da necessidade mundial do uso de fontes

renováveis de energia e de matérias primas, a indústria sucroalcooleira apresenta tendência de grande crescimento nos próximos anos. Além do açúcar e álcool, espera-se que as unidades industriais destinadas à transformação da cana-de-açúcar continuem a produzir mais energia, mais créditos de carbono e mais etanol de segunda geração e um grande número de matérias primas industriais (TEOFILO, 2012).

Apesar da necessidade de expansão da cultura, seja por área ou por produtividade, necessitará de um aumento substancial do consumo de fertilizantes (NEVES, et. Al., 2010). Segundo a (FAO, 2015) estima-se que o uso global de fertilizantes vai chegar a 200,5 milhões de toneladas em 2018, e que o consumo mundial de fertilizantes vai aumentar 1,8% anualmente pelos próximos três anos (ONU, 2016).

Os fertilizantes são responsáveis em termos médios por 40% dos aumentos nos rendimentos das culturas e poderá garantir a urgente compatibilização entre crescimento de população e a produção de alimentos e fibras, com aumento da colheita por unidade de área (MALAVOLTA, 1975).

Nesse sentido, é indispensável o desenvolvimento de variedades geneticamente melhoradas com maior eficiência no uso de nutrientes, em especial o nitrogênio. Nos últimos 50 anos, houve aumento significativo na produção de alimentos e na produtividade de plantas cultivadas através do desenvolvimento de tecnologias de produção (GODFRAY et al., 2010). A utilização de insumos agrícolas, em especial fertilizantes nitrogenados, representa normalmente uma parcela significativa do custo de produção para muitas culturas agrícolas (ROTHSTEIN, 2007).

2.2 Absorção de nitrato e amônio

As plantas cultivadas têm dependência fundamental em fertilizantes nitrogenados inorgânicos, principalmente na forma de $N\text{-NO}_3^-$ e $N\text{-NH}_4^+$ (LAM, et al., 1996). Estima-se que entre 50-70% do nitrogênio aplicado é perdido do sistema solo-planta (PEOPLES, 1995). A capacidade das plantas em capturar N do solo depende de diferentes variáveis, incluindo o tipo de solo, meio ambiente e espécies (HODGE et al., 2000 ; CRASWELL, et al., 1984).

As plantas retiram N, na forma de NO_3^- e NH_4^+ , sendo o NO_3^- a fonte predominante na maioria dos solos agrícolas bem aerados (CRAWFORD ; FORDE, 2002). Tendo em vista as principais formas de N que estão disponíveis para as plantas, diferentes mecanismos são usados para a absorção do N. Os processos absorção são mediados por transportadores que operam em uniporte (NH_4^+) e simporte ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$). A absorção inicial ocorre por meio dos

transportadores localizados na membrana plasmática das células epidérmicas e do córtex da raiz (SOUZA; FERNANDES, 2006).

A absorção do nitrato é um processo ativo, o qual ocorre devido a atividade das bombas de H^+ que geram energia que permite a entrada do íon na célula (SOUZA; FERNANDES, 2006). O mecanismo de absorção do nitrato está correlacionado com pH do apoplasma, quando fornecido em alto suprimento. Com base nisso, observa-se um aumento do pH do meio, o qual pode ser explicado pelo processo de absorção que ocorre por meio de um simporte ($N-NO_3^- / 2H^+$) (SANTOS et al., 2011). Já a entrada de amônio na célula, ocorre por um processo de absorção passiva, ou seja, a favor do gradiente de potencial eletroquímico, através de transportador do tipo uniporte (SOUZA; FERNANDES, 2006).

Após absorvido, o nitrogênio pode ser estocado no vacúolo, quando na forma de nitrato, ou ser reduzido e assimilado por meio da ação das enzimas Nitrato Redutase (NR), Nitrito Redutase (NiR), Glutamina Sintetase (GS) e Glutamato Sintase (GOGAT) (MARSCHNER, 1995).

O nitrato, depois de entrar na célula da planta, é reduzido a nitrito pela enzima nitrato redutase e a amônio pela nitrito redutase (CRAWFORD; FORDE, 2002). O NO_3^- não é apenas a fonte predominante de N para plantas, mas também atua como um sinal importante para vários processos de desenvolvimento. Esses eventos de sinalização inclui uma rápida mudança no padrão de expressão de genes envolvidos no metabolismo do carbono e N, além de outras vias metabólicas (GLASS, 1990). Entretanto, quando o amônio é absorvido, precisa ser rapidamente assimilado em esqueletos de carbono na produção de aminoácidos, afetando o desenvolvimento e arquitetura da raiz, e a relação raiz-parte aérea (SCHENK; BARBER, 1979a).

Para o nitrato (CRAWFORD; GLASS, 1998) e amônio (LUDEWIG et al., 2003), há dois tipos de sistema de absorção que foram descritos: sistemas de transporte de baixa afinidade (LATS), que operam em altas concentrações de nutrientes (> 1 mM); e sistemas de transporte de alta afinidade (HATS), que predominam na faixa do micromolar (< 1 mM) (WANG et al., 1993).

Curiosamente, não se sabe muito sobre os mecanismos moleculares e dos genes reguladores que controlam estas respostas ao nitrato, apesar de alguns fatores de transcrição e cinases terem sido associados a esses processos (KANT et al, 2011). (YANAGISAWA et al., 2004) estudando o fator de transcrição DOF1 em *Arabidopsis*, constataram maior assimilação de N sob baixas concentrações de N e um melhor crescimento da planta. A regulação do gene

GS1 por PpDOF5 também foi descrita em plantas de pinheiro por RUEDA-LOPEZ et al. (2008).

2.3 Eficiência no Uso de Nitrogênio em Cana-de-açúcar (Absorção, Remobilização, Assimilação)

O nitrogênio é um dos nutrientes que mais onera a produção de alimentos no mundo, portanto, um dos objetivos dos programas de melhoramento de culturas é maximizar a eficiência do uso de nitrogênio (GOOD, 2007). Com base nisso, existe a necessidade de selecionar e/ou produzir plantas cultivadas que utilizam eficientemente fertilizantes nitrogenados (HAJARI, 2015)

Em plantas, a EUN é complexa e pode ser influenciada por muitos fatores, como: eficiência de absorção de N a partir do solo, assimilação ou acúmulo do N, padrão de expressão dos transportes de N inorgânico e orgânico, eficiência de remobilização do N, além de diferentes fatores que afetam o metabolismo de carbono (MOOSE; BELOW, 2009). Tipicamente, a EUN é expressa como uma razão de produção (grãos, biomassa, etc...) pelo N fornecido ou absorvido (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

Além disso, EUN de plantas podem ser separado nos seus dois sub-componentes principais: i) a eficiência na absorção de N (NUpE), que descreve a capacidade da planta em absorver o N fornecido e; ii) a sua eficiência de utilização (NUtE), que representa a capacidade da planta em assimilar e remobilizar o N absorvido (MOLL et al., 1982; GOOD et al., 2004; MOOSE; BELOW, 2009). A EUN geral é, por conseguinte, o produto de NUpE e NUtE. Ao longo dos anos, várias definições de EUN foram propostas, as quais diferem em alguns aspectos básicos (GOOD et al., 2004; BRAUER; SHELP, 2010; GOOD; BEATTY, 2011).

A via de assimilação de nitrato inicia-se com a sua redução a nitrito e em seguida a amônio, já que este último é a única forma de N que as plantas são capazes de incorporar em esqueletos de carbono para formar os aminoácidos. O amônio, além de ser proveniente da redução do nitrato, também pode ser diretamente absorvido pelas raízes (WICKERT et al., 2007). Uma vez absorvido, o nitrato pode ser reduzido a amônio ou pode ser armazenado no vacúolo. Quando reduzido, o processo pode ser dividido em duas etapas: a primeira ocorre no citossol onde o nitrato é reduzido a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase (NR) usando NAD(P)H; a segunda ocorre no cloroplasto, onde o nitrito é reduzido a amônio pela ação do nitrito redutase (NiR) usando ferredoxina reduzida (TISCHNER, 2000). Para que o amônio seja assimilado são necessárias enzimas que incorporem o nutriente em esqueletos de

carbono. As principais enzimas que participam nesses processos são glutamina sintetase (GS) e a glutamato sintase (GOGAT) (LAM et al., 1996; SOUZA; FERNANDES, 2006).

Ensaio realizado com variedades cana-de-açúcar em solução nutritiva, a EUN de variedades foi calculado em termos de rendimento em sacarose (SCHUMANN et al., 1998) ou produção de biomassa (ROBINSON et al., 2007), em resposta ao fornecimento de N. Independentemente da sua definição exata, fenótipos e produtividade de genótipos em resposta a diferentes práticas de manejos de adubação nitrogenada, em diferentes condições ambientais, são geralmente utilizadas para determinar a EUN no campo (HAJARI, 2015).

Na Austrália (BIGGS, 2003) verificou que diferentes variedades de cana-de-açúcar desenvolveram-se de forma similar ao receber amônio ou nitrato em solução nutritiva. O autor afirma que as suas conclusões diferem de alguns estudos anteriores que indicaram um crescimento ligeiramente maior da cana-de-açúcar na presença de amônio.

Em cana, como em outras culturas, trabalhos em sistemas hidropônicos são empregados como abordagem alternativa (MOOSE; BELOW 2009) ou como estudo piloto antes de determinações a campo (ROBINSON et al., 2007; BEATTY et al., 2010) para caracterizar respostas fisiológicas e / ou molecular de plantas submetidas a tratamentos com N.

A capacidade das plantas em armazenar nitrato indica sua capacidade de adquirir N em excesso além do necessário para a assimilação. Este excedente de nitrato é geralmente armazenado nos vacúolos das folhas (GRANSTEDT; HUFFAKER, 1982) e está disponível para a mobilização sob condições de baixo N (BURNS et al., 1997; CRAWFORD GLASS, 1998). Vários autores indicam que a limitação na absorção de N em cana-de-açúcar está relacionada a sua baixa eficiência em translocar o nitrato das raízes para a parte-área (HAJARI, 2015).

Várias alterações fisiológicas e bioquímicas ocorrem em plantas como respostas adaptativas à limitação de N, incluindo um aumento da absorção de N por transportadores de alta afinidade, remobilização de N das folhas velhas para as folhas mais jovens e órgãos reprodutivos, retardando o crescimento, prejudicando a fotossíntese, e aumentando acúmulo de antocianinas (ONO et al., 1996; CHALKER-SCOTT, 1999; DING et al., 2005; DIAZ et al., 2006).

No entanto, os componentes da EUN interagem de múltiplas formas e podem envolver outras vias metabólicas além do metabolismo do N. Deste modo, melhorar NUE também depende de outros fatores que afeta a absorção de N, assimilação, eficiência e remobilização, como o status de C, água, luz, temperatura e tipo de solo (KANT, 2010).

2.4 Transportadores de nitrato e amônio

A absorção de nitrato é realizada por transportadores que são codificados por uma família multigênica. Alguns dos transportadores de nitrato são constitutivos, enquanto outros são induzidos pelo NO_3^- (AZEVEDO, 2009).

Evidências fisiológicas sugerem que, pelo menos, três tipos de sistemas transportadores de NO_3^- coexistem na membrana plasmática (GLASS; SIDDIQI, 1995; CRAWFORD; GLASS, 1998). Estudos da fisiologia destes sistemas de transporte por meio de curvas de concentração versus o influxo levou à constatação de que a cinética de cada um dos sistemas de transporte é resultado da operação de um conjunto de transportadores. Dados moleculares têm estabelecido que famílias multigênicas inteiras compõem os sistemas de transporte de alta e baixa afinidade (GLASS et al., 2001)

A função dos vários genes envolvidos na absorção de N e assimilação têm sido extensivamente estudada nas últimas décadas. Os primeiros trabalhos que surgiram foram realizados em *Arabidopsis*. Muitos autores encontraram em estudos moleculares, três famílias de transportadores de nitrato para esta planta; NRT1, NRT2, e CLC com 53 NRT1, 7 NRT2, e 7 CLC (KANT, 2011).

O Transporte constitutivo (cHATS), o qual opera em baixa capacidade e com alta afinidade, facilita a entrada de nitrato para dentro da raiz, permitindo a indução dos transportadores do sistema de alta afinidade e alta capacidade (iHATS). A regulação dos cHATS e iHATS ocorrem simultaneamente, entretanto, os constitutivos apresentam indução bem inferior os induzidos quando as plantas são expostas ao nitrato (ASLAM et al., ; 1992; KRONZUCHER et al ; 1996 a). O sistema (iHTAS) pode ser induzida pelo nitrato ou nitrito (ASLAM et al., 1996; SIDDIQI et al.,1992)

Os NRT2 são transportadores de nitrato de alta afinidade, enquanto a maioria dos membros da família NRT1, são caracterizadas de transportadores de nitrato de baixa afinidade, exceto NRT1.1 o primeiro transportador de nitrato identificado em plantas (TSAY et al., 1993), de dupla afinidade. Os NRT1.1, NRT1.2, NRT2.1, e NRT2.2 estão principalmente envolvidos na absorção do nitrato do solo (MILLER et al., 2007; TSAY et al., 2007; HO et al., 2009). Entre os membros da família CLC, CLCa é conhecido por mediar o acúmulo de nitrato no vacúolo da planta (DE ANGELI et al., 2006).

O transportador NRT1.1, também funciona como um sensor de nitrato e é ao mesmo tempo um transportador de alta e baixa afinidade dependendo da concentração do nitrato e da fosforilação e desfosforilação do resíduo da treonina na posição 101 (T101), mediada por uma

proteína quinase CIPK23, que pode fosforilar o NRT1.1 sob baixa concentração de nitrato, alterando a afinidade desse transportador para alta afinidade (HO et al., 2009).

As proteínas transportadoras de amônio são codificadas por uma família multigênica e apresenta ampla variação de padrões de cinética de absorção, fato que demonstra a plasticidade das plantas para a aquisição de formas reduzidas de N, abundantes durante um grande período na evolução das plantas superiores (AZEVEDO, 2009).

Estudos fisiológicos utilizando $^{15}\text{NH}_4^+$ ou $^{13}\text{NH}_4^+$ têm estabelecido duas categorias de transportadores (alta e baixa afinidade) contribuindo para o influxo de amônio (ULLRICH et al.; 1984; WANG et al., 1993a ; KRONZUCKER et al., 1996). Em arroz (WANG et al., 1993a), menciona que, enquanto o sistema de transporte de amônio de alta afinidade exibe cinética de saturação, o transporte de baixa afinidade não apresentou saturação quando utilizou-se até 50 mM, em plantas de pinheiro (KRONZUCKER et al., 1993a).

O amônio obtido por meio da redução do nitrato ou absorção direta do amônio ocorre pelos transportadores AMT (CRAWFORD; FORDE, 2002), com isso mais aminoácidos são produzidos por meio do ciclo da glutamina sintetase (GS) / glutamato sintase (GOGAT).

Em *Arabidopsis*, foi caracterizado outro gene transportador de amônio, nomeado *AtAMT2.1*, que é distante da família do *AtAMT1* (SOHLENKAMP et al.; 2000). Este gene parece ser mais expresso na parte aérea do que em raízes, sugerindo estar envolvido no transporte do amônio produzido na fotorrespiração para ser assimilado nos cloroplastos (GLASS, 2001).

2.5 Cinética de absorção de nitrato e amônio

Para caracterização de espécies e genótipos, quanto a eficiência de absorção de N, tem-se utilizado como ferramenta a avaliação de aspectos morfológicos, fisiológicos e moleculares envolvidos no processo (ANGHINONI et.al., 1989). A absorção de N é influenciada por atributos morfológicos de raízes e fatores ecofisiológicos das plantas (SCHENK; BARBER, 1979a). A eficiência de absorção dos nutrientes varia na razão direta da superfície e espessura das raízes porque esses atributos influenciam a superfície de absorção (VILELA; ANGHINONI, 1984). As diferenças no comportamento das plantas frente à eficiência no uso de nutrientes sugerem conhecimento no controle genético da nutrição. A aquisição de elementos minerais do ambiente está em função da morfologia radicular e da eficiência dos mecanismos de absorção (EPSTEIN; JEFFERIES, 1984; MARS; CHNER, 1986)

A eficiência de absorção de nutrientes é influenciada pelos parâmetros cinéticos que compreendem a velocidade máxima de absorção ($V_{m\acute{a}x}$), a afinidade dos transportadores pelo íon a ser transportado (constante de Michaelis-Menten, K_m) e a concentração do nutriente na solução nutritiva junto às raízes onde o influxo pára de ocorrer (C_{min}) (MARTINS, 2010)

Um genótipo ideal para absorção de N deveria ter alto $V_{m\acute{a}x}$ e baixos valores para K_m e C_{min} . Os valores desses parâmetros cinéticos podem variar de acordo com a idade (EDWARDS; BARBER, 1976;) concentração do nutriente nas plantas (GRESPLAN et al., 1998; MARTINEZ et al., 1993) morfologia radicular (WARNCKE; BARBER, 1974), mudanças climáticas (BASSIRIRAD, 2000) e, principalmente, entre os genótipos e as espécies vegetais (NIELSEN; BARBER, 1978).

Pesquisas sobre os mecanismos de absorção ativa de íons pelas plantas superiores ajusta-se com a hipótese da existência de carregadores iônicos de natureza enzimática, que apresentam sítios específicos de ligação. Dessa forma, a eficiência no processo de absorção de um dado nutriente pode ser dada através dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da equação de Michaelis-Menten (EPSTEIN, 1975; MARSCHNER, 1986; GLASS, 1990).

Em cana-de-açúcar, resultados de cinética de absorção de N encontrados na África do Sul por HAJARI et. al. (2014), indicaram que plantas cultivadas *in vitro* apresentaram uma afinidade semelhante (K_m) para as duas fontes de N quando fornecidos na concentração de 1,0 mM (K_m 0,28 mM para amônio e 0,29 mM para nitrato). Esse mesmos autores concluíram no mesmo experimento, que a cana apresenta preferencia de absorção de NH_4^+ em detrimento a NO_3^- .

Em outro trabalho, obtiveram taxas de absorção de N das plantas de arroz que foram ajustados ao modelo de Michaelis. Para o amônio o valor K_m para as plantas de arroz de quatro e nove semanas de idade, indicaram uma elevada afinidade para amônio, após a fertilização. A cinética de absorção de nitrato foi semelhante ao amônio quando o nitrato foi a única fonte de N. Contudo, observaram que amônio e o nitrato quando presentes, simultaneamente, na solução, a $V_{m\acute{a}x}$ para o absorção de nitrato foi severamente reduzida, enquanto o K_m foi afetado muito pouco (YOUNGDAHL et. al.; 1982).

2.6 Bactérias diazotróficas em cana-de-açucar: FBN e promoção de crescimento

No Brasil a pesquisa sobre bactérias diazotróficos e a sua importância para a FBN em gramíneas foi iniciada há mais de 40 anos pela pesquisadora Johanna Döbereiner. Seu primeiro trabalho com bactérias diazotróficas foi em 1953, no qual relatou pela primeira vez a ocorrência de bactérias do gênero *Azotobacter* em solos ácidos. Até então já se conhecia o

potencial de espécies deste gênero em fixar nitrogênio atmosférico, porém só haviam sido isoladas em solos do continente Europeu e Asiático. Cinco anos mais tarde, (DÖBEREINER; RUSCHEL, 1958) isolaram e descreveram a bactéria *Beijerinckia fluminensis* da rizosfera da cana-de-açúcar em solos tropicais, demonstrando o potencial dos diazotróficos em se associarem com gramíneas.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é realizada por representantes de diversos grupos filogenéticos bacterianos, que são denominados diazotróficos. Estas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses ou estar associados às plantas, sendo neste último caso denominados de diazotróficas associativas. As bactérias diazotróficas associativas podem contribuir para o crescimento vegetal não só pelo fornecimento de nitrogênio, mas também por outros mecanismos como produção de fitormônios, solubilização de fosfatos, antagonismo a fitopatógeno, entre outros (MOREIRA, et al., 2010).

Bactérias diazotróficas podem desempenhar um papel importante na reabilitação e sustentabilidade de diferentes ecossistemas diretamente pela FBN, produção e liberação de substâncias que regulam o crescimento das plantas, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (NERONI ; CARDOSO, 2007) e aumento da solubilização e entrada de nutrientes (ASGHAR et al., 2002). Na última década intensificaram-se os estudos com bactérias diazotróficas endofíticas pela sua potencialidade como agente de promoção de crescimento e proteção de plantas (MARQUES JR. et al., 2008).

As bactérias diazotróficas endofíticas mais frequentemente encontradas associadas à cultura da cana-de-açúcar pertencem aos gêneros *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. *Gluconacetobacter diazotrophicus* é a espécie mais estudada e ocorre em grande número nas raízes e na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar (CAVALCANTE; DÖBEREINER, 1988). Outra bactéria endofítica de grande importância pertence ao gênero *Herbaspirillum*. As espécies mais estudadas são: *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*, muito semelhantes, e que podem ser diferenciadas pelo uso de fontes de carbono (OLIVARES et al., 1997).

A estirpe *H. seropedicae* possui menor especificidade hospedeira quando comparada com *G. diazotrophicus*, já foi isolada de muitas gramíneas além de cana-de-açúcar. Também tem sido isolada de outras plantas não leguminosas, incluindo palmeiras. Pode infectar raízes, colmos e folhas de gramíneas, mas não é encontrada em folhas de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 1997).

Na EMBRAPA-CNPAB está em fase de teste de um possível inoculante comercial para cultura da cana-de-açúcar. O inoculante é composto por cinco espécies de bactérias

diazotróficas endofíticas; *G. diazotrophicus*, *H. rubrisubalbicans*, *H. seropedicae*, *A. amazonense* e *Bukholderia sp.*, e os resultados demonstram uma economia de até 30 kg de N ha⁻¹ por ano (FREITAS, 2011).

A contribuição da fixação biológica de N₂ associativa à nutrição vegetal não é tão significativa como as simbioses, entretanto se for considerada a grande extensão de terras recobertas por gramíneas e cereais, esta se torna importante, em termos globais. Tem-se verificado que áreas de pastagem com gramíneas e cana-de-açúcar têm mantido níveis razoáveis de produtividade sem aplicação de fertilizantes nitrogenados, o que indica que este fenômeno poderia estar relacionado com a contribuição da FBN, por microrganismos endofíticos (MOREIRA et al., 2010).

Está estabelecido que as bactérias fixadoras de N₂ pode ser associada com plantas de cana e que N₂ atmosférico pode ser uma importante fonte de N para a cana-de-açúcar (OLIVARES 1997; BODDEY et al., 2001) No Brasil, (OLIVEIRA et al. 2002) estimaram em seus estudos, utilizando diluição de ¹⁵N-isótopo, que mais de 60 do nitrogênio total acumulado em algumas variedades de cana foram derivados da FBN. (URQUIAGA et al. 1992) observaram, em plantas micropropagadas de cana-de-açúcar, uma contribuição da FBN de até 70% do nitrogênio total, pela inoculação de uma mistura de cinco espécies de bactérias.

Bactérias diazotróficas também foram isoladas em cana-de-açúcar na Austrália (CHAPMAN et al., 1992;. LI; MACRAE 1991, 1992; MURPHY E MACRAE, 1985; WALSH E HARRISON, 1997). Segundo estes autores, bactérias fixadoras de N₂ presentes em canaviais comerciais, recebem aplicações altas de fertilizante nitrogenado, rotineiramente. Segundo esses autores (REIS et al., 2000; MUTHUKUMARASAMY et al., 1999) relatam que a fertilização alta de N reduz as populações de bactérias fixadoras de N₂. No entanto, para (BIGGS, 2003) a importância relativa da fixação biológica de N₂ para a economia de N na cana-de açúcar, continua ainda sendo objeto de estudo pelos pesquisadores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Efeito de diferentes proporções de nitrato e amônio em variedades contrastantes de cana-de-açúcar– Experimento I

3.1.1 Condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação nas dependências da Embrapa Agrobiologia, localizada em Seropédica, RJ (latitude 22° 45' S, longitude 43° 41' N e altitude que varia entre 30 e 70 m), na região da Baixada Fluminense (ALMEIDA et al., 1999).

3.1.2 Variedades

Foram utilizadas duas variedades comerciais de cana-de-açúcar: 'RB867514' e 'IACSP95-5000', sendo a primeira selecionada para solos de baixa fertilidade natural e a segunda para solos férteis.

'**RB867515**' – 27 % da área plantada (APTA 2017). Alta produtividade agroindustrial; Ótima adaptabilidade e estabilidade de produção em solos de baixa fertilidade natural e menor capacidade de retenção de água. Alta velocidade de crescimento, porte alto, hábito de crescimento ereto, alta densidade de colmo, de cor verde arroxeado que se acentua quando expostos e fácil despalha. Destaques: Tolerante à seca e boa brotação de soqueira, mesmo colhida crua; alto teor de sacarose, crescimento rápido com alta produtividade (HOFFMANN et al, 2008).

'**IACSP95-5000**' (SP84-2066 x SP80-185) – 2,7 % da área plantada (APTA 2017). Alta produtividade agroindustrial; ótima adaptabilidade e estabilidade de produção em solos de média fertilidade. Porte muito ereto, ótima brotação de soqueira, apresentando bom perfilhamento e fechamento de entrelinhas, não apresentando tombamento e florescimento, e ainda apresentando resistência as principais doenças (UDOP, 2017).

As plantas utilizadas no experimento foram derivadas de plantas matrizes (Figura 1). As mesmas foram obtidas pelo sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB), na forma de minitoletes (segmentos de colmos com gemas individualizadas) sugerido por (LANDELL et al., 2012). Na etapa de brotação, a germinação dos minitoletes (uma gema) foi submetida a tratamento térmico a 52°C por 30 min (tratamento curto - SANGUINO et al., 2006) para controlar o Raquitismo da soqueira - Bactéria (*Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*) e em seguida foram tratados com solução de fungicida (Comet®) a 0,1% (1mL/L), por 3 min.

Após, foram dispostos em caixas plásticas contendo substrato estéril: areia e vermiculita (2:1) e irrigados diariamente com água filtrada, por 25 dias. As gemas que brotaram foram dispostas em tubetes de 180 cm³, preenchidas com substrato *Multiplant*, por 20 dias. Em seguida, as plantas foram padronizadas e transferidas para solução nutritiva por 40 dias.

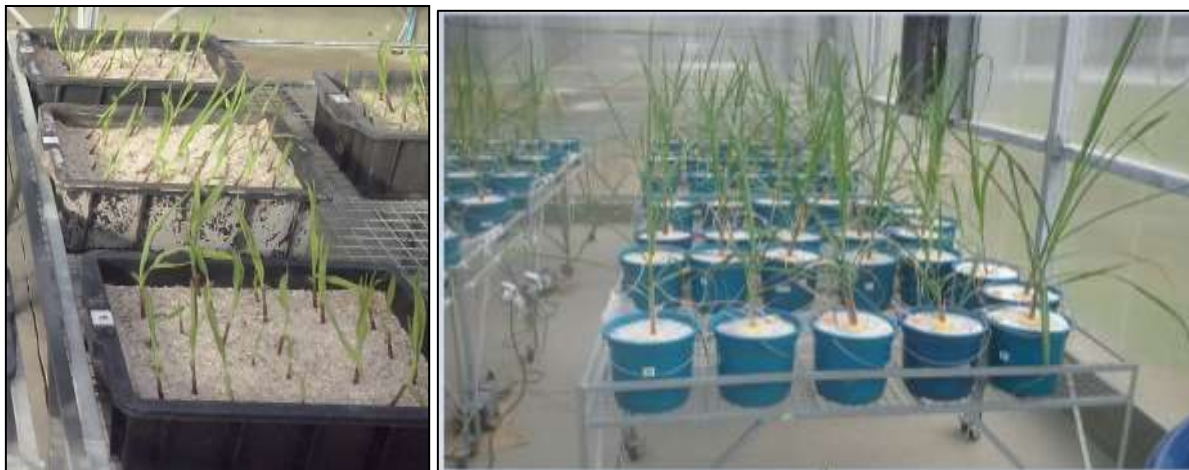


Figura 1. Produção de mudas e sistema de hidroponia com aeração para o crescimento das plantas de cana de açúcar.

3.1.3 Tratamentos e delineamento experimental

Os tratamentos utilizados no experimento I foram: duas variedades de cana-de-açúcar e cinco proporções de N (100% NO₃) ; (75% NO₃ / 25% NH₄) ; (50% NO₃ / 50% NH₄) ; (25% NO₃ / 75% NH₄) e (100% NH₄) (2x5). A concentração final de N foi de 3,0 mM. O delineamento foi em blocos casualizados, com quatro repetições.

3.1.4 Biomassa seca de raiz, colmo e folha

Os órgãos das plantas foram separados em raiz, colmo e folha. As raízes foram submetidas à lavagem em água filtrada, em seguida as partes das plantas foram submetida à secagem em estufa com circulação forçada de ar, a 65°C, por 3 dias, e pesadas para a determinação da biomassa seca (MARTINS, 2010).

3.1.5 Avaliações biométricas

Para determinar o comprimento e largura de folha +3 foi utilizada uma régua métrica, para determinar a altura das plantas foi utilizada fita métrica, e o diâmetro de colmos foi obtido com uso de um paquímetro de acordo com o método proposto por (MARTINS; LANDELL, 1995).

3.1.6 Conteúdo relativo de clorofila

O conteúdo de clorofila foi estimado utilizando um clorofilômetro “SPAD-502”. A leitura de três medidas nas folhas +1 foi considerada para estimativa da média. A leitura (unidade SPAD) corresponde ao teor do pigmento na folha, e seu valor, é equivalente à quantidade de clorofila existente na folha.

3.1.7 Atividade da nitrato redutase

Para a análise da atividade da nitrato redutase (JAVORSKY, 1973) foram separadas amostras de 200 miligramas de tecido vegetal fresco para imersão em tubo de ensaio contendo meio de incubação específico (5 mL). Esse meio de incubação foi preparado a partir da mistura de Tampão Fosfato pH 7,5 (909 mL), n-propanol (27,2 mL) e KNO₃ (1,84 g). Os tubos de ensaio contendo as amostras em meio de incubação foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria durante 30 minutos a temperatura de 30 graus Celsius. Após essa etapa, o nitrito produzido foi submetido à reação colorimétrica.

Para a reação colorimétrica, duas alíquotas (0,4 mL) da solução de incubação foram colocadas em meio reacional composto por sulfanilamida 1% em HCl 3 M (0,3 mL) e N-naftil-etileno di-amino 0,02% (0,3 mL).

Após 20 minutos em repouso, adicionou-se água destilada (4 mL) e a concentração de nitrito determinada em espectrofotômetro na absorvância de 540 nanômetros. A confecção da curva padrão foi feita com várias concentrações de nitrito de sódio. A atividade foi expressa em $\mu\text{mol de N-NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ massa fresca h}^{-1}$.

3.2 Frações solúveis

Após cada coleta, as plantas tiveram suas raízes, colmos e folhas separadas e as massas frescas determinadas. De cada amostra (parte) foi analisada a atividade da nitrato redutase (JAVORSKY, 1971). Além disso, foram separadas subamostras (0,5 grama) de material fresco de cada parte da planta (em duplicata) para armazenamento em 20 mL de etanol e, posteriormente, preparo do extrato alcoólico. O procedimento para preparo do extrato foi executado a partir da maceração do material vegetal em etanol 80%, filtração do extrato obtido, partição com clorofórmio e elevação do volume da fração polar (menos densa) para 25 mL com etanol 80%. Com o extrato obtido, foram feitas as análises das seguintes frações solúveis: N-amino livre (YEMM; COCKING, 1955), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977), N-NO₃⁻ (CATALDO et al., 1975) e açúcares solúveis (YEMM; WILLIS, 1954).

3.2.1 Dosagem de N-NO₃⁻

Na determinação dos teores de nitrato (CATALDO et al., 1975), foram utilizadas alíquotas de 0,05mL do extrato alcoólico em meio reacional específico visando a determinação colorimétrica do nitrato. Para o meio reacional utilizou-se Hidróxido de Sódio 2N (4,75 mL) e uma solução de ácido salicílico 5% em H₂SO₄ concentrado (0,2 mL).

Para a reação, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio e, posteriormente, adicionou-se vagarosamente o ácido salicílico 5% em H₂SO₄ concentrado. Após a agitação, as amostras foram deixadas 20 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, adicionou-se o hidróxido de sódio 2N. Após realizar uma nova agitação, a absorvância a 410 nanômetros foi determinada em espectrofotômetro.

Para a determinação da concentração de N-nitrato nas amostras, utilizou-se como parâmetro a curva padrão de nitrato de potássio. Os teores de N-NO₃⁻ foram expressos em µmol de N-NO₃⁻ g⁻¹ massa fresca.

3.2.2 Dosagem de N-NH₄⁺

Para a dosagem de N-amônio (FELKER, 1977), alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico foram submetidas a reação colorimétrica em meio reacional específico. Para o meio reacional, foi preparada previamente uma solução contendo Fenol (5 g) e Nitroprussiato de Sódio (25 mg) diluídos até o volume de 500 mL em água destilada. Separadamente, preparou-se outra solução contendo Dicloroisocianurato de Sódio (0,31 g) e Hidróxido de Sódio (15 g) também elevado até 500 mL com água destilada. De cada solução preparada utilizou-se 2,5 mL para o meio reacional.

Para a reação colorimétrica, as amostras (0,5 mL) foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e submetidas a agitação. Após 30 minutos em temperatura ambiente, realizou-se uma nova agitação e posterior leitura em espectrofotômetro na absorvância de 630 nanômetros.

Para a determinação da concentração de N-amônio nas amostras, utilizou-se como parâmetro a curva padrão de cloreto de amônio. Os teores de N-NH₄⁺ foram expressos em µmol de N- NH₄⁺ g⁻¹ massa fresca.

3.2.3 Dosagem de açúcares solúveis

Para a determinação de açúcares solúveis (YEMM; WILLIS, 1954), foram utilizadas alíquotas de 0,2 mL das amostras de extrato alcoólico para reação colorimétrica em meio

reacional específico. O meio reacional foi preparado com Antrona (0,4 g) diluída em uma mistura de ácido sulfúrico e água ultra pura na proporção de 5:2, respectivamente. Após o preparo, a mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, utilizada para o meio reacional.

Para a reação colorimétrica, a solução de Antrona em ácido sulfúrico e água ultra pura (5 mL) foi depositada em tubos de ensaio de 50 mL em banho de gelo. Após 5 minutos, foi adicionada lentamente a amostra (0,2 mL) e, posteriormente, etanol 80% (0,8 mL) para diluição das amostras (2,5 vezes). A mistura foi deixada em repouso por mais 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, agitou-se. Para o desenvolvimento da cor verde, os tubos foram devidamente vedados com papel alumínio e levados ao banho maria a temperatura de 100 graus Celsius por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em água e as leituras em espectrofotômetro realizadas em absorvância a 620 nm. A curva padrão foi feita com várias concentrações de glicose. Os teores de açúcares solúveis foram expressos em μmol de açúcares solúveis g^{-1} massa fresca.

3.2.4 Dosagem de N-amino livre

Para a determinação de N-amino livre (YEMM; COCKING, 1955), foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico para reação colorimétrica em meio reacional específico. O meio reacional foi preparado a partir de tampão citrato 0,2 M pH 5,0 (1 mL) e uma mistura de Metil Celossolve, KCN e Ninhidrina (1,2 mL). Para o preparo da mistura, foi inicialmente preparada uma solução de Ninhidrina em Metil Celossolve (5 % m/v). Em seguida, uma solução de KCN em Metil Celossolve foi preparada a partir de KCN 0,01 M (5 mL) dissolvido em Metil Celossolve até completar 250 mL. Finalmente, a solução contendo a Ninhidrina foi misturada à solução contendo o KCN na proporção 1:5.

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e submetidas à agitação. Posteriormente, os tubos de ensaio foram fechados com papel alumínio e submetidos a aquecimento em banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Após o aquecimento, os tubos de ensaio contendo as amostras em meio reacional foram resfriados em água corrente por 5 minutos e adicionado etanol 60% (3 mL) ao seu conteúdo. Após nova agitação, a absorvância a 570 nanômetros foi determinada em espectrofotômetro.

Para a determinação da concentração de N-amino nas amostras, foi utilizada uma curva padrão de Leucina. Os teores de N-amino foram expressos em μmol de N-amino g^{-1} massa fresca.

3.2.5 N-total

Para a digestão sulfúrica (TEDESCO, 1982), 200 mg de amostra vegetal seca e moída foi transferida para tubo de digestão. Posteriormente, adicionou-se lentamente H_2O_2 30% (1,0 mL), H_2SO_4 concentrado (1,5 ml) e a mistura catalisadora (0,7 g) em capela de exaustão. A mistura catalisadora foi preparada a partir da trituração de Na_2SO_4 (100 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (10g) e Selênio (1g) em almofariz. Após a deposição dos reagentes as amostras foram submetidas a uma sequência periódica de aquecimento em bloco digestor. Após esfriar em temperatura ambiente, a solução obtida a partir da digestão foi dissolvida até 50 ml com água destilada. Em seguida, a solução foi filtrada e armazenada em geladeira até o momento das determinações.

Na determinação de N-total (TEDESCO, 1982) foram utilizadas alíquotas de 20 mL de extrato proveniente da digestão. Para a etapa inicial as alíquotas foram colocadas no balão do destilador de nitrogênio e ao copo do equipamento foi depositado NaOH 50% (10 mL). Em erlenmeyer de 50 mL s depositou-se a mistura indicadora de ácido bórico (5 mL).

A mistura indicadora foi preparada por meio da adição de água destilada fervida (900 mL) a ácido bórico (20 g), solução de verde de bromo cresol (25 mL) e a uma solução de vermelho de metila (5 mL). A solução de verde de bromo cresol foi preparada a partir da pesagem de 0,025 g dessa substância e sua dissolução até 25 mL com etanol. Para a solução de vermelho de metila foi também pesado 0,025 g e completado com etanol até 25 mL.

Após o acréscimo do NaOH 50% à amostra, o equipamento foi ligado e o termostato ajustado para o nível de 7,5. Cerca de 40 mL do destilado foi recolhido em erlenmeyer de 50 mL contendo a mistura indicadora com ácido bórico. Com a solução obtida procedeu-se a titulação com H_2SO_4 0,05 N padronizado com TRIS. O volume de ácido sulfúrico gasto para a titulação foi anotado visando os cálculos para a determinação do N-total. O teor de N-total foi expresso em g kg^{-1} de massa seca.

3.3 Absorção de nitrogênio em variedades contrastantes de cana-de-açúcar inculadas ou não com bactérias diazotróficas – Experimento II

3.3.1 Preparo do Inoculante

O inoculante utilizado neste estudo foi composto por um coquetel de bactérias diazotróficas inicialmente selecionada por (OLIVEIRA et. al 2002, 2006). Na Tabela 1 são descritas as espécies, identificação das estirpes e origem do isolamento. Todas as bactérias

utilizadas neste estudo foram cedidas pelo laboratório de coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

Tabela 1. Bactérias que compõe o inoculante para cana-de-açúcar – espécie, estirpe e origem do isolamento.

Espécie	Estirpe	Origem do isolamento
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	BR11281 ^T	Raízes - <i>Saccharum</i> sp. (híbrido)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	BR11335	Raízes - <i>Saccharum</i> sp. (SP70-1143)
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	BR11504	Colmos - <i>Saccharum</i> sp. (SP70-1284)
<i>Paraburkholderia tropica</i>	BR11366 ^T	Gemas - <i>Saccharum</i> sp. (SP71-1406)
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	BR11145	Colmos - <i>Saccharum</i> sp. (CB45-3)

Tabela 2. Gênero e condições de cultivo das bactérias diazotróficas que compõe o inoculante para cana-de-açúcar.

Gêneros	Meio de cultivo	pH
<i>Gluconacetobacter</i>	LGIP + 10 mmol L de NH ₄ SO ₄	5,5
<i>herbaspirillum</i>	JNFB + 1 g NH ₄ Cl	5,8
<i>Azospirillum</i>	LGI + 1 g de KNO ₃	6-6,2
<i>Burkholderia</i>	JMV + 10 mmol L ⁻¹ de glutamato de sódio	5

As mudas utilizadas neste experimento foram derivadas das variedades: ‘RB867515’ e ‘IACSP95-5000’. As mesmas foram obtidas pelo sistema de multiplicação de mudas pré-brotadas (MPB), na forma de minitoletes (segmentos de colmos com gemas individualizadas) sugerido por (LANDELL et al., 2012).

Na etapa de brotação, a germinação dos minitoletes (uma gema) foi submetida a tratamento térmico a 52°C, por 30 min (tratamento curto - SANGUINO et al., 2006) para controlar o Raquitismo da soqueira - Bactéria (*Leifsonia xyli* subsp. *Xyli*) e em seguida foram tratados com solução de fungicida (Comet®) a 0,1% (1mL/L), por 3 min. Após, os minitoletes foram inoculadas com as cinco estirpes de bactérias diazotróficas contidas no inoculante desenvolvido para cana-de-açúcar, cedidas pela Embrapa Agrobiologia. A suspensão foi preparada com 5 g de turfa em 5 L de água destilada, com 10⁷ células bacterianas por grama de turfa. As gemas foram imersas por cerca de 30 min nessa suspensão (REIS et al., 2009), e as que não receberam inoculação foram imersas em água e turfa estéril. Em seguida os minitoletes foram dispostos em caixas plásticas contendo substrato estéril,

areia e vermiculita (2:1) e irrigados diariamente com água filtrada, por cerca de 25 dias. As gemas que brotaram foram dispostas em tubetes de 180 cm³, preenchidas com substrato *Multiplant*, e cultivadas por cerca de 20 dias. Em seguida, as plantas foram padronizadas, e transferidas para solução nutritiva, por 40 dias.

3.3.2 Tratamentos e delineamento experimental

Para o estudo da absorção de $K^{15}NO_3^-$ e $(^{15}NH_4)_2SO_4$ em raízes de cana-açúcar, foram utilizadas duas variedades comerciais “RB867515” e “IACSP95-5000” inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com 4 repetições. O experimento foi realizado em sistema hidropônico, contendo em cada vaso 6 L de solução nutritiva modificada de (HOGLAN e ARNON 1950), a 1/2 da força iônica, com 3,0 mM de N e pH 5,8. O controle automático da temperatura do ar circulado e aeração a cada 15 min mantiveram as plantas nas condições adequadas em casa de vegetação (Figura 1).

Para indução do processo de transporte de nitrato, as plantas foram crescidas em suficiência de N (+N; 3 mM de KNO_3^-) por 24 dias, em seguida foram para solução nutritiva sem N (-N) por 72h, e transferidas para solução com N (+N; KNO_3^-) por 30 min. Após isso, as plantas foram submetidas aos tratamentos nas concentrações de (25, 75, 150 e 300 μM de $K^{15}NO_3^-$ a 60 % em átomos de ^{15}N) por um período de 20 min, e lavadas imediatamente após a exposição ao ^{15}N . Foram coletadas 4 réplicas biológicas em cada concentração amostrada.

As plantas submetidas ao $(^{15}NH_4)_2SO_4$ foram crescidas em suficiência de N (+N; 1,5 mM de $(NH_4)_2SO_4$) por 40 dias, em seguida foram transferidas para solução nutritiva sem N (-N) por 72h. Após isso, as plantas foram submetidas aos tratamentos nas concentrações de (25, 75, 150 e 300 μM de $^{15}NH_4SO_4$ a 98 % em átomos de ^{15}N) por um período de 10 min, e lavadas imediatamente após a exposição ao ^{15}N . Foram coletadas 4 réplicas biológicas em cada concentração amostrada.

As raízes, colmo e folhas foram então coletadas, secas e moídas e analisadas no espectrômetro de massa de ionização por impacto de elétrons, no Laboratório de Ciclagem de Nutrientes da Embrapa Agrobiologia.



Figura 2. Ilustração do experimento de cinética de absorção de $^{15}\text{NO}_3^-$ e $^{15}\text{NH}_4^+$ em cana-de-açúcar.

3.3.3 Análises estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SISVAR 4.3 para verificação da normalidade e homogeneidade das variâncias dos erros pelo teste Shapiro-Wilk. Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o Scott Knott a 95% de confiança.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de diferentes proporções de nitrato e amônio no crescimento e no acúmulo de biomassa seca em cana-de-açúcar

4.1.1 Acúmulo de biomassa

Em plantas cultivadas, a relação entre N e o acúmulo de biomassa é influenciada por múltiplos processos fisiológicos. O crescimento da planta e alocação de C e N entre órgãos-tecidos são dependentes da absorção de N e da assimilação de carbono via fotossíntese, processos que são fundamentais para acúmulo de biomassa (GASTAL e LEMAIRE, 2002; SEREZINO, 2015).

Apesar da importância do N como nutriente limitante do crescimento e produtividade da cana-de-açúcar, poucos estudos foram realizados com o objetivo de definir claramente o efeito do nitrato e amônia e suas combinações no acúmulo de biomassa em cana de açúcar. A eficiência na aquisição de N pelas raízes a partir do solo consiste num dos processos essenciais para uso eficiente do nitrogênio. Desta forma, a eficiência na absorção de N reflete na produção de biomassa das plantas, entretanto isso depende do transporte de nitrato e amônio na raiz (KROUK et al., 2010).

Considerando a importância da absorção de nitrato e amônio pelas raízes de cana-de-açúcar e sua influência no acúmulo de biomassa, o presente estudo foi realizado empregando as seguintes fontes de N: KNO_3 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Plantas de cana-de-açúcar da variedade 'RB867515' e 'IACSP95-5000' foram crescidas por 24 dias em solução nutritiva, e submetidas a diferentes proporções de $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ (100/0 ; 75/25 ; 50/50 ; 25/75 ; 0/100) na concentração total de 3,0 mM de N.

Analisando-se os resultados de raiz, observam-se maiores acúmulos de biomassa na 'RB867515' nos tratamentos (100 NO_3^- ; 75 $\text{NO}_3^- / 25 \text{NH}_4^+$ e 50 $\text{NO}_3^- / 50 \text{NH}_4^+$) enquanto que a 'IACSP95-5000', foi no (75 $\text{NO}_3^- / 25 \text{NH}_4^+$ e 50 $\text{NO}_3^- / 50 \text{NH}_4^+$). No colmo, o maior acúmulo foi observado nos tratamentos (100 NO_3^- ; 75 $\text{NO}_3^- / 25 \text{NH}_4^+$ e 50 $\text{NO}_3^- / 50 \text{NH}_4^+$), e na variedade 'IACSP95-5000' (100 NO_3^-) (Figura 3). Nas folhas, a variedade 'RB867515' acumulou mais biomassa no tratamento (50 $\text{NO}_3^- / 50 \text{NH}_4^+$), enquanto que a 'IACSP95-5000', não apresentou diferença entre os tratamentos (Figura 3). Tanto na raiz quanto no colmo, o acúmulo de biomassa foi significativamente menor nos tratamentos com 75 e 100% de N- NH_4^+ nas duas variedades, sendo o decréscimo bem mais acentuado na variedade 'IACSP95-5000' (Figura 3). No colmo, a 'RB867515' foi superior em ganho de biomassa em

relação à 'IACSP95-5000', em todos os tratamentos, exceto 100 NO₃⁻ (Figura 3). É importante salientar que a variedade 'IACSP95-5000' apresentou forte redução no acúmulo de biomassa no colmo em todos os tratamentos contendo amônio (Figura 3).

Com base nesses resultados, na raiz e no colmo foram observada redução no acúmulo de biomassa conforme o aumento na proporção de amônio na solução nutritiva. Isso demonstra que o metabolismo de amônio consome muito carbono, ou seja, grande parte dos carboidratos produzidos pela planta pelo processo fotossintético é direcionada para sua assimilação imediata na raiz (FERNANDES, et al., 2006). Portanto, as plantas cultivadas com nitrato em maiores proporções, o acúmulo de biomassa foi maior.

Com base nisso, recentes estudos foram realizados com a finalidade de entender a influência do nitrato e amônio no acúmulo de biomassa. Na África do Sul, foi demonstrada em variedades comerciais de cana-de-açúcar, 'NCo376' e 'N36' (baixa-moderada EUN), e 'N12' e 'N19' (alta EUN) maior acúmulo de biomassa quando o N era fornecido na forma de nitrato numa concentração de 4 mM de N (HAJARI et al.; 2015). Estudos realizados por CAMPOS, (2013) avaliando o acúmulo de biomassa seca da parte aérea de duas variedades de cana-de-açúcar ('RB855156' e 'CTC 05'), suplementadas com amônio e nitrato, foram observados que não houve diferenças significativas entre as variedades, no entanto, sob a forma nítrica, a 'CTC 05' apresentou maior incremento de produção de biomassa seca.

Andrade (1994) avaliando o efeito do nitrato e amônio combinado ou não em (*Panicum maximum* Jacq.), constatou que a produção de biomassa seca e a concentração de N total foram superiores aos das plantas tratadas apenas com amônio, tanto na parte aérea quanto na raiz. Estes resultados observados por esses autores foram similares aos encontrados no presente estudo, o qual indica que o nitrato tem efeito positivo no acúmulo de biomassa seca em cana-de-açúcar. Com base nisso, é possível verificar que a preferência da cana-de-açúcar em absorver amônio (ROBINSON et al., 2011 ; SEREZINO, 2015) não está correlacionada com maior acúmulo de biomassa.

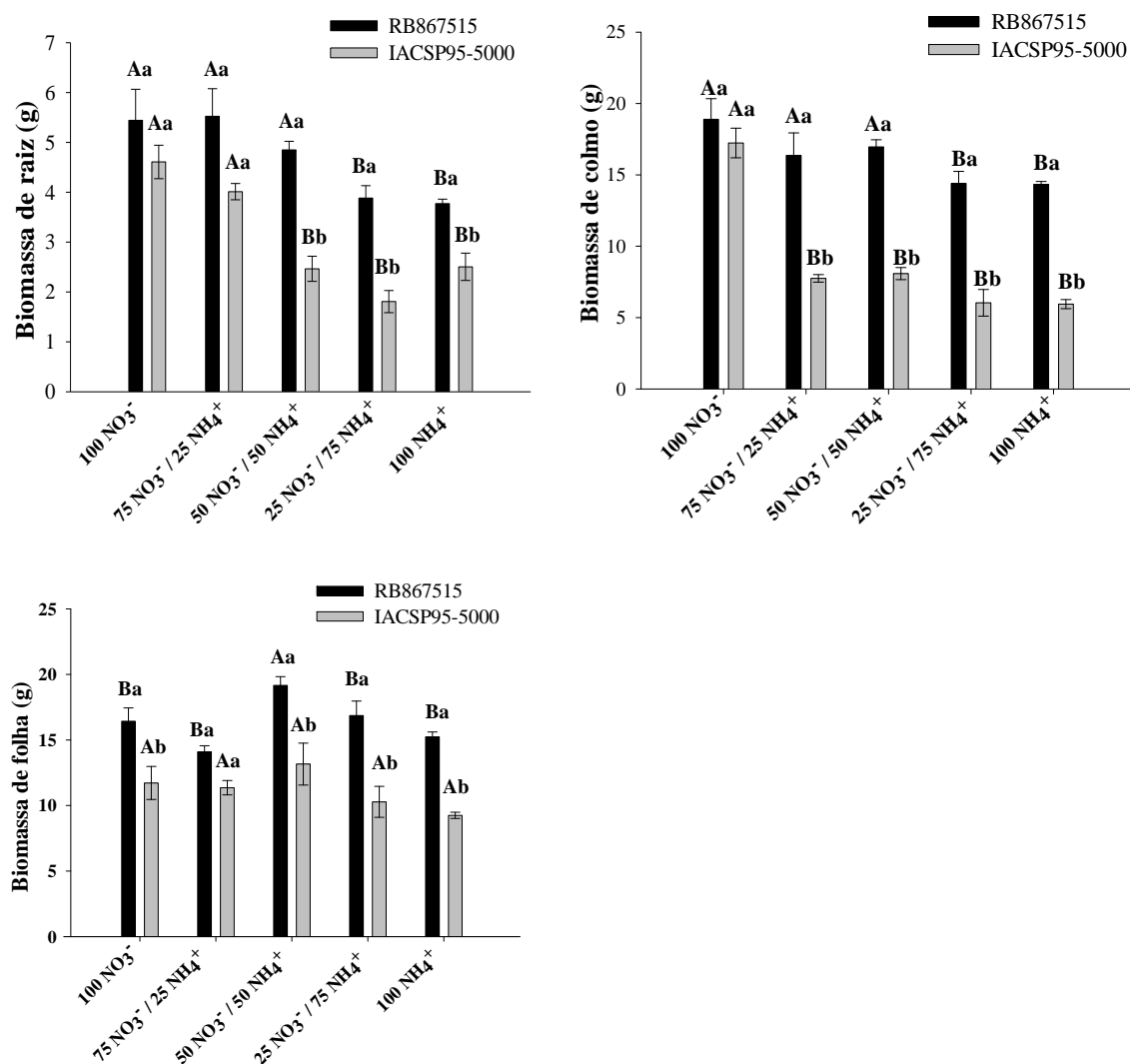


Figura 3. Efeito de diferentes proporções de NO₃⁻ e NH₄⁺, no acúmulo de biomassa seca de raiz e colmo, (g MS⁻¹). Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os tratamentos e variedades, respectivamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. *n*=4

4.1.2 Dados biométricos

No período inicial de desenvolvimento da cana-planta, a maior parcela de biomassa seca produzida destina-se a o crescimento das folhas (MACHADO et al., 1982). Portanto, parâmetros biométricos das plantas durante a estação de crescimento permitem a utilização de índices fisiológicos na tentativa de explicar as diferenças varietais quanto à produção econômica (MACHADO et al., 1982)

A investigação do crescimento de plantas de cana-de-açúcar suplementada com amônio impressiona porque que a sua assimilação é energeticamente menor em relação a nitrato, na qual pode beneficiar o crescimento e acúmulo de sacarose (BIGGS, 2003). Desta

forma, as altas taxas de absorção de amônio pelas raízes promove a idéia de que a economia de energia metabólica pode ter efeitos benéficos na nutrição das plantas (DILLEWIJN, 1952). Entretanto, a sua eficiência de uso é menor quando comparada a nitrato devida à rápida assimilação, indicando que em plantas de cana-de-açúcar, a maior taxa de aquisição de amônio não está correlacionada com maior eficiência do seu uso (DILLEWIJN, 1952).

Na Tabela 3 encontram-se os valores biométricos das variedades antes da aplicação dos tratamentos. Avaliando-se o desenvolvimento vegetativo da cana-de-açúcar suplementada com diferentes proporções de N, na forma de nitrato e amônio, por 40 dias em solução nutritiva, observar-se que não houve diferença significativa nos parâmetros biométricos em ambas as variedades, exceto para leitura de 'SPAD' na variedade 'IACSP95-5000' (Tabela 4).

Esses resultados demonstram que, independente das variedades e da forma combinada de nitrato e amônio, as plantas apresentaram respostas semelhantes aos tratamentos. Estes resultados foram semelhantes de (DILLEWIJN, 1952; ARMAS et al., 1992; RAI et al., 1988; TISHCHENKO¹ et al., 1991 apud BIGGS, 2003) que observaram que em cana-de-açúcar as plantas cultivadas sobre nitrato e amônio não apresentaram diferença significativa no crescimento.

Na Austrália, estudos realizados com uma variedade comercial de cana-de-açúcar 'Q141' submetida a condições de disponibilidade de nitrato e amônio em concentrações crescentes de N (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16; 32; e 64 mM), demonstraram que o crescimento, altura, número de perfilho e diâmetro de colmo foram similar nas diferentes concentrações de N, entretanto houve uma redução geral na altura da planta com o aumento de N na forma de amônio comparada a nitrato (BIGGES, 2003).

Com base nisso, a diferença não encontrada neste estudo sugere que plantas de cana-de-açúcar responde pouco a adubação nitrogenada no início de seu cultivo (ROBINSON et., al., 2011), não sendo possível discriminar qual das variedades desenvolve melhor nos diferentes tratamentos.

Tabela 3. Biometria e leitura de SPAD antes da aplicação dos tratamentos

RB867515					
Fontes de N (%)	Leitura SPAD	Altura (cm)	Largura foliar (cm)	Comprimento de folha (cm)	Diâmetro de colmo (cm)
100 NO ₃ ⁻	45	17	2,15	76,38	1,06
75 NO ₃ ⁻ / 25 NH ₄ ⁺	46,55	17,5	2,15	89	1,18
50 NO ₃ ⁻ / 50 NH ₄ ⁺	47,78	16,45	1,98	85	1,22
25 NO ₃ ⁻ / 75 NH ₄ ⁺	45,85	14,25	2,28	83,25	1,18
100 NH ₄ ⁺	48,75	20,25	2,05	90	1,33

IACSP95-5000					
Fontes de N (%)	Leitura SPAD	Altura (cm)	Largura foliar (cm)	Comprimento de folha (cm)	Diâmetro de colmo (cm)
100 NO ₃ ⁻	45,7	16,38	2,2	80,75	1,28
75 NO ₃ ⁻ / 25 NH ₄ ⁺	47,1	22,25	2,23	81,75	1,29
50 NO ₃ ⁻ / 50 NH ₄ ⁺	48,48	18,75	2,3	94	1,25
25 NO ₃ ⁻ / 75 NH ₄ ⁺	47,73	19,38	2,18	106,75	1,26
100 NH ₄ ⁺	47,05	15,88	1,7	62,5	1,26

Tabela 4. Efeito de diferentes fontes de N (NO₃⁻ e NH₄⁺) na leitura do ‘SPAD’ e na biometria (cm), 40 dias em solução nutritiva.

‘RB867515’					
Fontes de N (%)	Leitura SPAD	Altura (cm)	Largura foliar (cm)	Comprimento de folha (cm)	Diâmetro de colmo (cm)
100 NO ₃ ⁻	52,8	35,5	3,3	122,75	1,83
75 NO ₃ ⁻ / 25 NH ₄ ⁺	50,53	39,25	3,3	130,88	1,92
50 NO ₃ ⁻ / 50 NH ₄ ⁺	54,38	32,25	3,3	117,25	1,92
25 NO ₃ ⁻ / 75 NH ₄ ⁺	53,6	36,88	3,2	112	1,79
100 NH ₄ ⁺	53,2	42,88	3,6	109,5	2,14
Estatística - Teste F					
Tratamentos	1,16 ns	0,75 ns	0,37 ns	2,17 ns	0,89 ns
Blocos	2,67 ns	0,58 ns	1,09 ns	0,69 ns	0,86 ns
Variedades	3,52 ns	2,85 ns	2,54 ns	0,00 ns	0,52 ns
Tratamento*Variedades	1,69 ns	0,60 ns	0,19 ns	1,69 ns	1,11 ns
Média Geral	51,1	39,81	3,47	118,54	1,95
Coef. Variação	5,16	23,18	14,31	9,86	14,56

'IACSP95-5000'					
Fontes de N (%)	Leitura SPAD	Altura (cm)	Largura foliar (cm)	Comprimento de folha (cm)	Diâmetro de colmo (cm)
100 NO ₃ ⁻	47,08 a	40,14	3,58	116,25	2,04
75 NO ₃ ⁻ / 25 NH ₄ ⁺	51,43 b	42,25	3,55	117	1,95
50 NO ₃ ⁻ / 50 NH ₄ ⁺	53,13 b	42,75	3,75	124	2,06
25 NO ₃ ⁻ / 75 NH ₄ ⁺	52,95 b	43,63	3,45	125,5	2,02
100 NH ₄ ⁺	51,95 b	39,63	3,63	110,25	1,85
Estatística - Teste F					
Tratamentos	3,37*	0,27 ns	0,19 ns	1,13 ns	0,37 ns
Blocos	2,67 ns	0,58 ns	1,09 ns	0,69 ns	0,86 ns
Variedades	3,52 ns	2,85 ns	2,54 ns	0,00 ns	0,52 ns
Tratamento*Variedades	1,69 ns	0,60ns	0,19 ns	1,69 ns	1,11 ns
Média Geral	51,1	39,81	3,47	118,54	1,95
Coef. Variação	5,16	23,18	14,31	9,86	14,56

⁽¹⁾ Valores seguidos da mesma letra, em cada coluna, não diferem entre si (Scott-Knott, 5%).

*Significativo, a 5% de probabilidade.

4.2 Características quantitativas da raiz e parte aérea das plantas

4.2.1 Frações nitrogenadas

4.2.2 Teores de nitrato

Avaliando-se os teores de nitrato nos órgãos/tecidos da variedade 'RB867515', observa-se que na raiz não houve diferença nos teores de nitrato em relação aos tratamentos, exceto na proporção 100 NH₄⁺, que mostrou menor teor de nitrato (Figura 4). No colmo da 'RB867515' e 'IACSP95-5000', o menor teor de nitrato foi na proporção 100 NH₄⁺ (0,095, 0,15 $\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), respectivamente. Na folha, a 'RB867515' não apresentou diferença de teores de nitrato em relação aos tratamentos, entretanto na 'IACSP95-5000' foi observada maior teor na proporção 100 NO₃⁻ e 75 NO₃⁻ / 25 NH₄⁺ (1,10 e 1,05 $\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ MF}$), respectivamente. Diferença entre as variedades foram observadas no colmo, sendo a 'IACSP95-5000' a variedade que mais acumulou nitrato quando comparada com a 'RB867515'.

É possível observar que a variedade IACSP95-5000 apresenta maiores teores de NO₃⁻ nos colmos e folhas que a RB867515 (Figura 4). Esse resultado pode, em parte, explicar o maior acúmulo de biomassa de colmo e folha observados na variedade RB867515 quando

comparado a IACSP95-5000 (Figura 3), sobretudo nos tratamentos com maiores proporções de NH_4^+ .

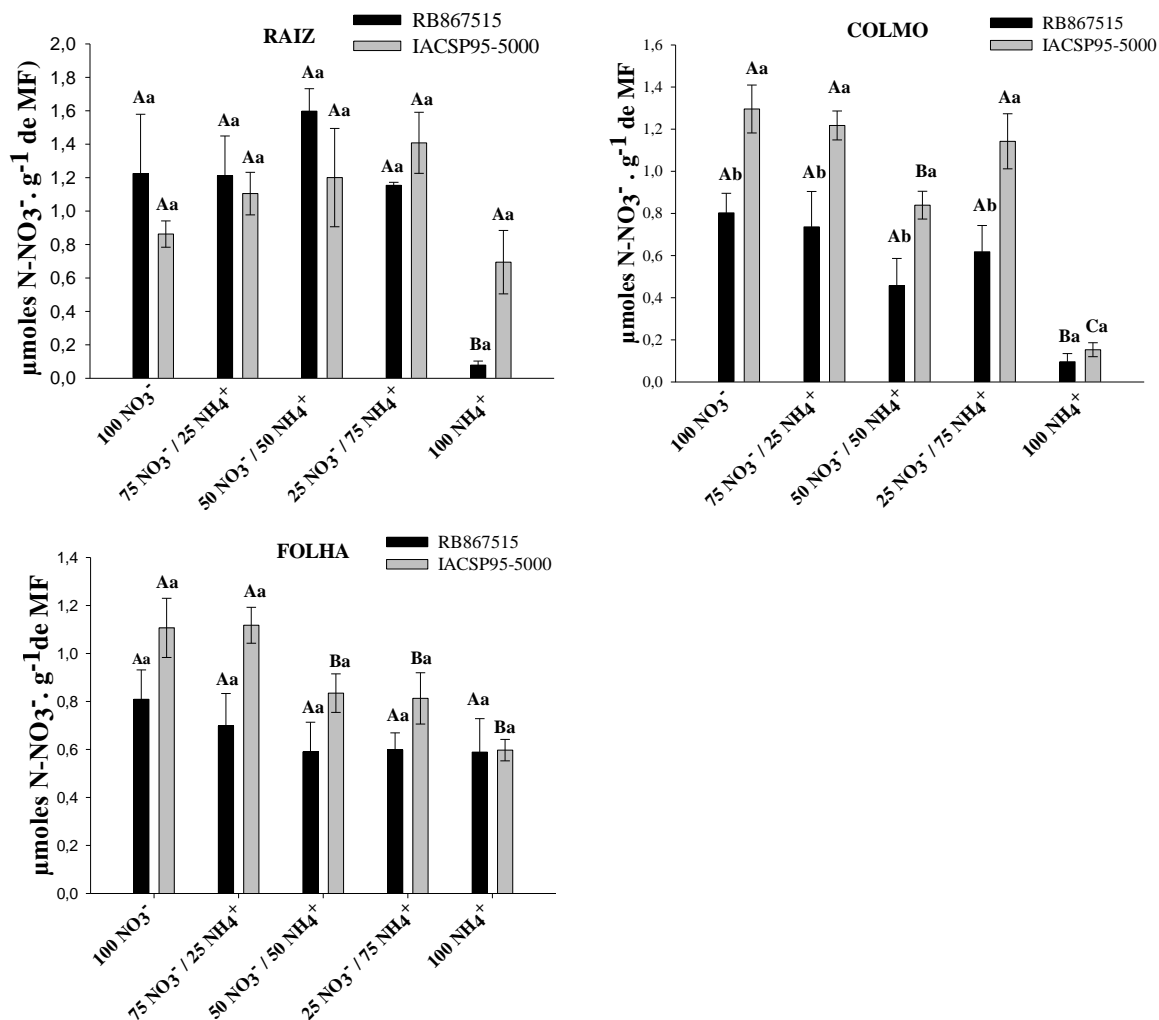


Figura 4. Teores de N-NO_3^- ($\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ massa fresca) da raiz, colmo e folha de duas variedades de cana-de-açúcar, suplementadas com diferentes proporções de N(%). Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os tratamentos e variedades, respectivamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. $n=4$

4.2.3 Teores de amônio

Em algumas gramíneas, o suprimento de nitrato e amônio, em quantidades equivalentes, resultou primeiramente na absorção do amônio, sendo a absorção do nitrato significante apenas quando as concentrações do amônio eram muito baixas, o qual poderá ser reduzido nas raízes ou transportado para a parte aérea; nessas plantas, o amônio absorvido é assimilado principalmente nas raízes (MATTSSON & SCHJOERRING, 2002).

Avaliando-se os teores de amônio nos órgão/tecidos da cana-de-açúcar, é possível observar que a raiz foi o órgão que apresentou maiores teores de amônio, quando comparada a colmo e folha (Figura 5). Este resultado indica que na fase vegetativa, o metabolismo de N na raiz é bastante ativo. Além disso, este aumento dos teores de amônio na raiz pode estar relacionado com a redução do nitrato presente na combinação com amônio nos tratamentos.

Estudos recentes foram realizados para entender o processo de aquisição de nitrogênio inorgânico em cana-de-açúcar, e os resultados demonstram a preferência da cultura em absorver amônio em detrimento a nitrato (ROBINSON et al, 2011 ; SEREZINO, 2015). Os nossos resultados mostram que independente da fonte de N ou combinações, os teores de N- NH_4^+ são semelhantes, indicando que teores de amônio não é uma variável segura para indicar como se comporta o metabolismo de N nas plantas (Figura 5).

Devido ao fato da assimilação de amônio ocorrer basicamente nas raízes e ser tóxico em altas concentrações, grandes quantidades de açúcares são necessárias para incorporação do amônio em esqueletos de carbono para formação de aminoácidos (FERNANDES, et. al 2006). Isso evidencia que a assimilação do amônio na raiz é dependente de açúcares que são produzidos pela fotossíntese e translocados da parte aérea para as raízes. Além disso, este resultado demonstra que o processo de aquisição de nitrato pode ser afetado pelo aumento da concentração de amônio/N-amino nas raízes (ROBINSON et. al 2011), culminando na baixa eficiência de absorção de nitrato. No entanto, os maiores acúmulos de amônio nas raízes de cana-de-açúcar observados neste estudo, não se justificam pelo déficit de esqueleto de C para a síntese de N-amino, pois os teores de açúcares observados não foram insuficientes para incorporação do amônio. Portanto, este comportamento pode indicar apenas que nessa fase de desenvolvimento da cana-de-açúcar, o sistema radicular apresenta metabolismo de N bastante ativo.

BRITTO et al. (2001) estudaram a aquisição de amônio em plantas de cevada (sensível) e arroz (tolerante) ao excesso de amônio. Os autores relataram que, nas células da raiz de cevada ocorre uma falha na regulação do fluxo de amônio, dessa forma, as células iniciam um sistema de efluxo de amônio através da membrana plasmática, consumindo energia. No entanto, para as plantas de arroz a defesa do excesso de amônio foi devida ao eficiente sistema de controle do potencial de membrana.

SCHORTEMAYER et. al. (1997) avaliaram quatro híbridos de milho e fontes de N (nitrato e amoniacal) na concentração de 20 mmol L^{-1} . Relataram que em dois híbridos a produção de massa seca foi prejudicada pela suplementação com N amoniacal, entretanto em outros dois híbridos testados não houveram efeitos maléficis quando cultivados com amônio.

Os autores concluíram que o suprimento adequado de esqueletos de carbono para a assimilação de amônio nas raízes é necessário para o crescimento sob condições de altas concentrações de amônio, e que houve diferenças genotípicas entre as variedades para esta característica fisiológica.

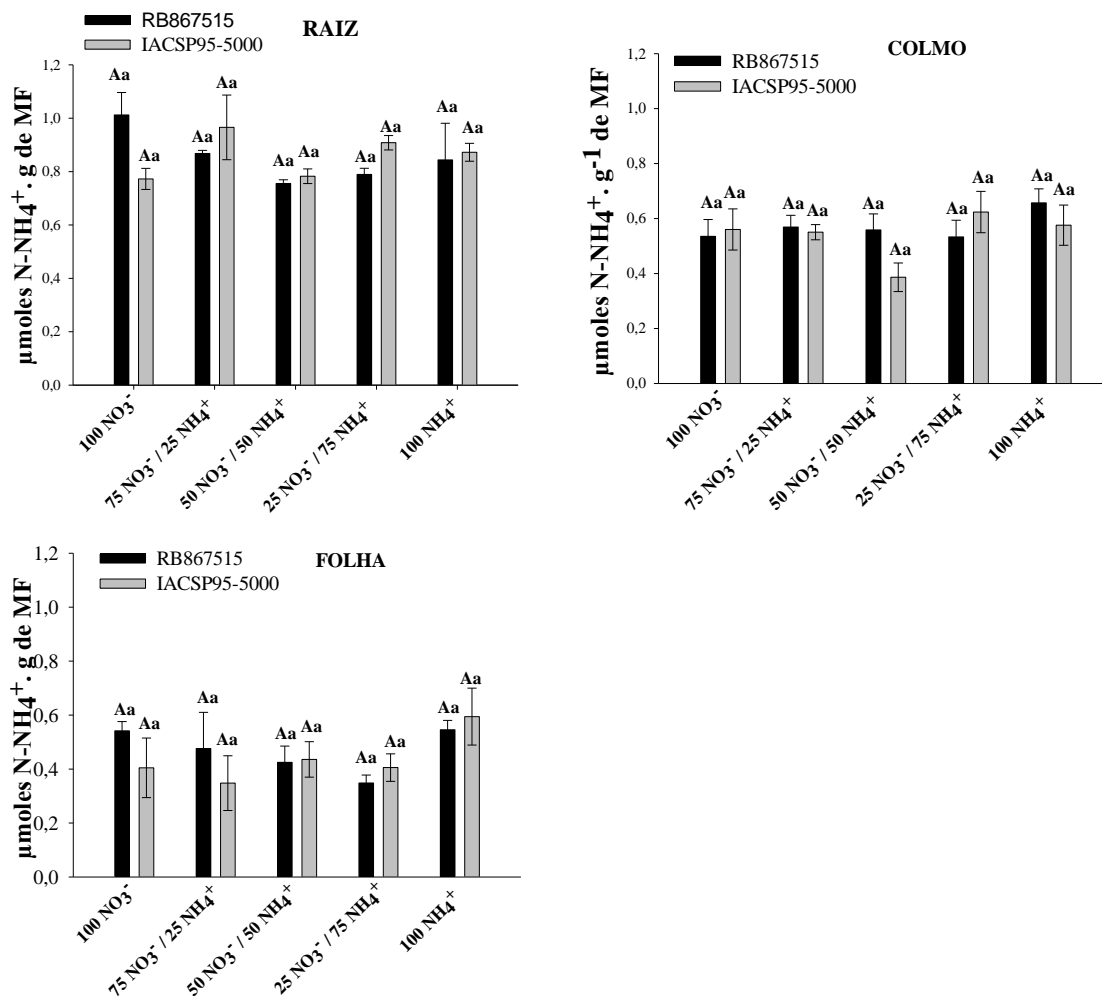


Figura 5. Teores de N-NH₄⁺ (µmoles de NH₄⁺ g⁻¹ massa fresca) da raiz, colmo e folha de cana-de-açúcar suplementada com diferentes fontes e proporções de N. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os tratamentos e variedades, respectivamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. *n*=4

4.2.4 Teores de açúcares solúveis

Os teores de açúcares solúveis nos tecidos vegetais são indicadores de energia prontamente disponível para o metabolismo celular, assim, maiores teores são encontrados na fase inicial de desenvolvimento, principalmente nas folhas pela grande demanda energética para o crescimento vegetativo (SOUZA, 1995). A sacarose inicia seu transporte através do

tecido do floema e sofre modificações nas células de armazenamento antes de se depositar no vacúolo. O armazenamento inclui a inversão de sacarose, interconversão e fosforilação de glicose e frutose, síntese de sacarose fosfato e acúmulo ativo através do tonoplasto. Para sair do vacúolo, a sacarose deve novamente passar pela inversão a frutose e glicose (VIANA, 2011).

Em relação aos tratamentos, na raiz, a variedade RB apresentou maior teor de açúcares (6,89 e 8,25 mg glicose.g MF⁻¹) quando fornecido 75 NO₃⁻/25 NH₄⁺ e 50/50, respectivamente. Na ‘IACSP95-5000’, os maiores teores foram (8,67 e 9,10 mg glicose.gMF⁻¹) sob 75 NO₃⁻/25 NH₄⁺ e 50 NO₃⁻/50 NH₄⁺ (Figura 6). No colmo, não houve diferença de teores de açúcares na ‘RB867515’ em relação aos tratamentos, porém na ‘IACSP95-5000’ maiores teores observados foram nos tratamentos 25NO₃⁻/75NH₄⁺ e 100NH₄⁺. Na folha, não houve diferença de teores de açúcares tanto na ‘RB867515’ como na ‘IACSP95-5000’ em relação aos tratamentos.

Comparando às variedades em relação aos teores de açúcares em cada tratamento, a ‘RB867515’ apresentou menor teor de açúcares na raiz no tratamento (25 NO₃⁻/75 NH₄⁺ e 100 NH₄⁺) comparado a ‘IACSP95-5000’, não havendo diferença entre as variedades nos outros tratamentos. No colmo, a ‘RB867515’ obteve menor teores de açúcares no tratamento (100 NH₄⁺), quando comparada a ‘IACSP95-5000’. Na folha, a ‘IACSP95-5000’ foi a que apresentou menores teores de açúcares nos tratamentos (100NO₃⁻ e 50 NO₃⁻/50 NH₄⁺), (Figura 6).

Em estudos “*in vitro*” com cana-de-açúcar sob fornecimento de concentração crescentes de N, verificou-se após 30 dias de cultivo que, quanto maior o nível de N no meio, menor foi o teor de açúcar acumulado (DONATO et al., 2003). Com base nisso, a concentração de N utilizada neste estudo não variou, portanto a variação no acúmulo de açúcares entre as variedades e tratamentos pode estar relacionada com a fonte e proporções de N usadas. A absorção de N é dependente da disponibilidade de energia (CRAWFORD, 1995). Os carboidratos solúveis são fonte de energia para a assimilação do N reduzido (SOUZA, 1995). Em plantas de trigo, a capacidade das raízes em absorver N foi diretamente correlacionada com o suprimento de carboidratos (HUPPE ; TURPIN, 1994).

Com base nesses resultados, os teores de açúcares pode variar de acordo com o genótipo, estágio de desenvolvimento da planta, do ambiente em que é cultivada e da fonte de nitrogênio.

Aparentemente, o metabolismo de N nas raízes da variedade RB é mais intenso nos tratamentos com as maiores proporções de amônio, onde se observa fortes diferenças entre as variedades (Figura 6).

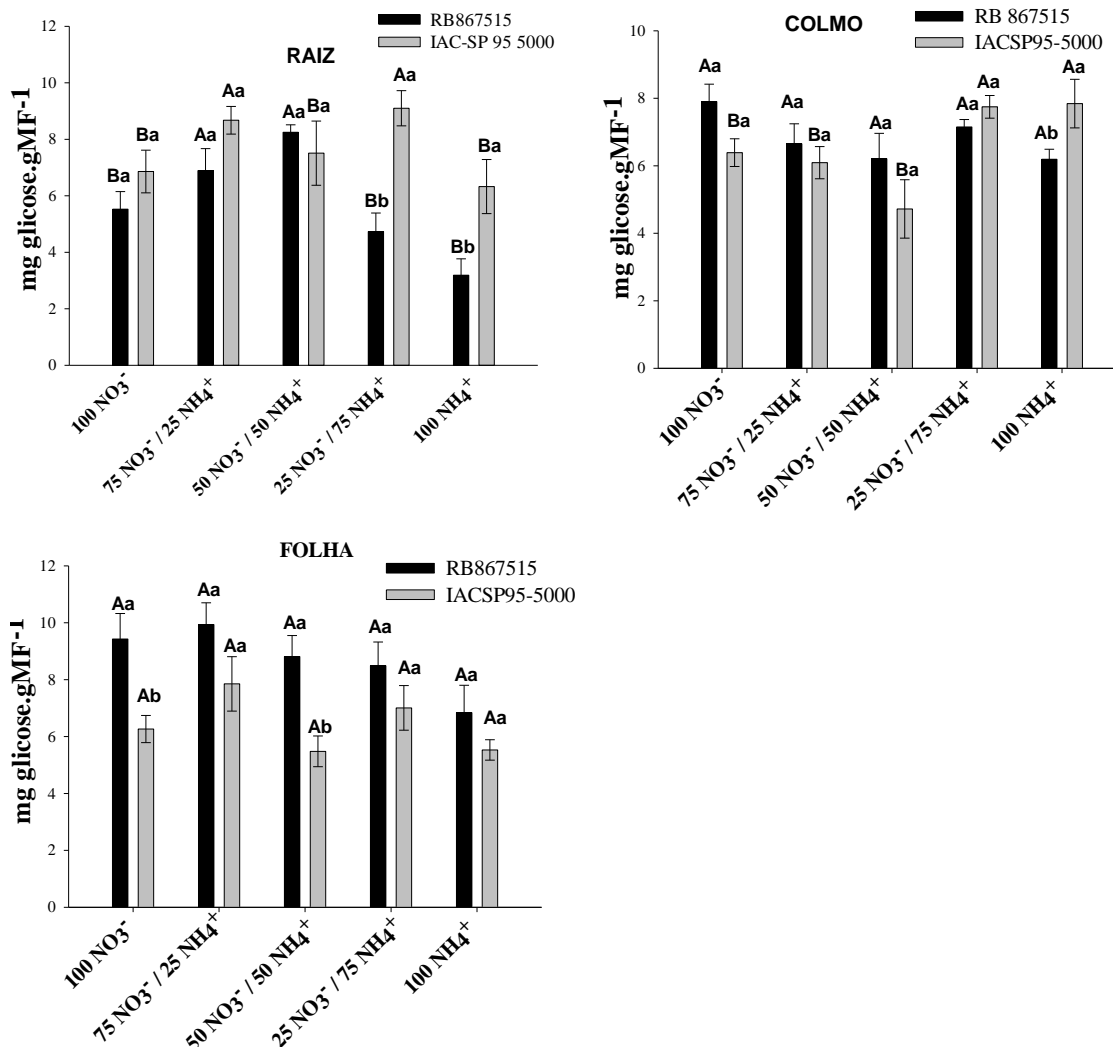


Figura 6. Teores de açúcares solúveis (mg glucose.gMF⁻¹) da raiz, colmo e folha de cana-de-açúcar suplementada com diferentes fontes e proporções de N. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os tratamentos e variedades, respectivamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. *n*=4

4.2.5 Teores de N-amino

Na variedade ‘IACSP95-5000’, os teores de N-amino na raiz foram maiores nos tratamentos, 50 NO₃⁻/50 NH₄⁺, 25 NO₃⁻/75 NH₄⁺ e 100 NH₄⁺ (10,79, 9,53 e 10,50 μmol N-amino.gMF⁻¹), respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa entre estes tratamentos. No colmo e folha, os teores de N-amino na ‘IACSP95-5000’ foram significativamente maiores nos tratamento, 100 NO₃⁻ e 100 NH₄⁺ (15,78; 11,76 μmol N-

amino.gMF⁻¹), respectivamente. Os resultados observados neste estudo evidenciam que absorção de amônio pela raiz, e os maiores teores de nitrato no colmo, correlacionam com maiores os teores de N-amino nesses órgãos/tecidos em cana-de-açúcar.

Diferenças entre as variedades em relação aos tratamentos foram observadas. Na raiz, a 'RB867515' apresentou menor teor de N-amino no tratamento (50 NO₃⁻ / 50 NH₄⁺) do que 'IACSP95-5000', enquanto que no colmo a 'RB867515' apresentou menor teor de N-amino nos tratamentos (100 NO₃⁻ e 75 NO₃⁻ / 25 NH₄⁺) em relação à 'IACSP95-5000'. Na folha, não foi observada diferença entre as variedades quanto aos teores de N-amino (Figura 7)

O acúmulo de amônio em plantas pode ocorrer tanto devido ao aumento absoluto na disponibilidade de amônio quanto devido ao aumento relativo do amônio, como consequência de um déficit de esqueleto de C, ou seja, a uma deficiência dos cetoácidos para síntese de N-amino e N-amida e que esta síntese de N-amino/N-amida reduz o excesso de N-amino livre nos tecidos (FERNANDES, et. al., 2006).

Em cana-de-açúcar, 23 aminoácidos foram identificados em folhas e colmos por (DILLEWIJN, 1952; PARISH, 1956), sendo asparagina e glutamina os mais predominantes nas seivas do xilema de folhas e no colmo, seguido por ácido aspártico e ácido glutâmico (PARISH, 1965). Em estudos utilizando formas de N, a glutamina foi o aminoácido dominante em folhas de cana-de-açúcar sob fornecimento de nitrato, seguida por alanina e serina, sob amônio. (TISHCHENKO¹ et al., 1991 apud BIGGS, 2003). Além disso, foram constatados valores de N-amino total entre (1200 µg g⁻¹ MF e 2160 µg g⁻¹ MF) quando as plantas foram suplementadas com nitrato e amônio, respectivamente. Este resultado corrobora com o encontrado neste estudo, onde o fornecimento de amônio favorece o aumento dos teores de N-amino em ambas as variedades de cana-de-açúcar.

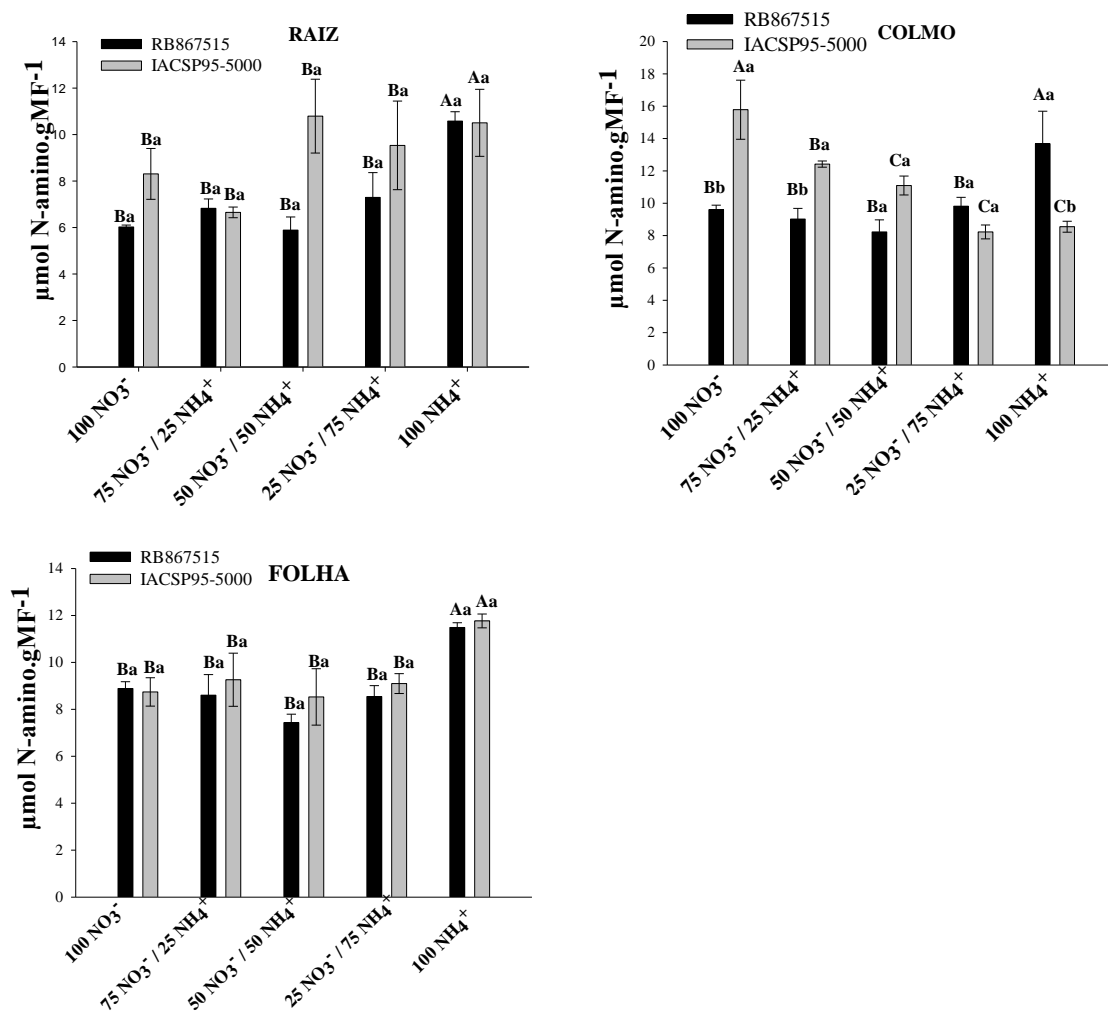


Figura 7. Teores de N-amino ($\mu\text{g g}^{-1}$ MF) da raiz, colmo e folha de cana-de-açúcar suplementada com diferentes fontes de N (%). Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os tratamentos e variedades, respectivamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. $n=4$

4.2.6 Atividade da Nitrato redutase

A nitrato redutase (NR) é considerada a primeira enzima na cadeia de redução do nitrogênio dentro do processo de assimilação do N nas plantas (PURSINO et al, 1994). Sua atividade tem dois pontos de regulação: transcrição que leva algumas horas e é responsável por mudanças diárias na atividade com a maior atividade durante as primeiras horas do dia; e a pós-tradução, que é um processo muito mais rápido, que ocorre por mecanismos de fosforilação e desfosforilação da enzima e leva alguns minutos, sendo importante para desativar a enzima quando a planta passa da luz para o escuro, evitando o acúmulo de nitrato na falta de ferredoxina (SODEK, 2004).

Em espécies tropicais, a redução do nitrato a nitrito pela NR ocorre de preferência na parte aérea, independente da concentração externa desse íon (NAMBIAR et al., 1988). Uma vez absorvido em plantas C₄ (cana-de-açúcar), será reduzido a nitrito pela enzima NR, localizada no citossol das células do mesofilo. O nitrito será reduzido a amônio pela enzima nitrito redutase nos cloroplastos ou plastídios de raízes (VAUGHN & CAMPBELL 1988).

A atividade da NR foi menor na raiz quando comparada a folha, em ambas as variedades. A maior atividade da NR na raiz foi na 'RB867515' (0,06 $\mu\text{mol N-NO}_2\text{-g}^{-1}$ de MF. h⁻¹) no tratamento (75 NO₃⁻ / 25 NH₄⁺), enquanto a menor foi (0,0206 $\mu\text{mol N-NO}_2\text{-g}^{-1}$ de MF. h⁻¹) no tratamento 100 NH₄⁺. No entanto na variedade 'IACSP95-5000', não houve diferença na atividade em relação aos tratamentos.

No colmo da variedade 'RB867515', não houve diferença na atividade da NR em relação aos tratamentos, já na 'IACSP95-5000', a atividade da enzima neste órgão/tecido foi significativa maior nos tratamentos com as maiores proporções de NO₃⁻. Na folha, a 'RB867515' não diferiu na atividade da enzima em relação aos tratamentos, exceto nos 100 NH₄⁺, onde se observou menor atividade da NR (0,14 $\mu\text{mol N-NO}_2\text{-g}^{-1}$ de MF. h⁻¹). Na 'IACSP95-5000', a folha apresentou comportamento distinto em relação à atividade da NR quando comparada aos tratamentos, ou seja, a atividade da NR foi maior nos tratamentos (100 NO₃⁻ e 75 NO₃⁻ / 25 NH₄⁺), respectivamente.

A variedade 'IACSP95-5000' apresentou menor atividade da NR na raiz, nos tratamentos (100 NO₃⁻ e 75 NO₃⁻ / 25 NH₄⁺) em relação a 'RB867515'. No entanto, no colmo observou que nos tratamentos (100 NO₃⁻ e 75 NO₃⁻ / 25 NH₄⁺) a 'RB867515' teve menor atividade comparada a 'IACSP95-5000'. Na folha, observou-se que a 'RB867515' apresentou-se menor atividade da NR em relação a 'IACSP95-5000', sob os tratamentos (75 NO₃⁻ / 25 NH₄⁺ e 50 NO₃⁻ / 50 NH₄⁺) (Figura 8).

Cherel et al. (1986) compararam a atividade da NR em folhas de varias espécies de plantas e classificou a cana-de-açúcar em um grupo de plantas de atividade de NR alto, 6 a 7,2 $\mu\text{mol N-NO}_2\text{-g}^{-1}$ de MF. h⁻¹), juntamente com milho, milheto e cevada. Entretanto, estes valores não correspondem com atividade da NR encontrada neste estudo. Em contraste (ARMAS et al. 1992) mensurou a atividade da NR em folhas de cana-de-açúcar na qual foi observada (0,125 e 0,056 $\mu\text{mol N-NO}_2\text{-g}^{-1}$ de MF. h⁻¹) sob suplementação de nitrato e amônio, respectivamente. Isso pode indicar que a variação da atividade da NR pode ocorrer entre genótipos, estação de cultivo, fase de crescimento das plantas e adubação nitrogenada (KAUR et al., 1992, ONKAR et al., 1991). Entretanto, esses autores observaram em raiz de cana-de-açúcar, atividade da NR (0,022 e 0,01 $\mu\text{mol N-NO}_2\text{-g}^{-1}$ de MF. h⁻¹) submetida às mesmas

formas de N. Esse resultado demonstrou que neste órgão a atividade da NR foi menor, quando comparada a folha (ARMAS et al. 1992). Na Austrália, estudos realizados em cana-de-açúcar suplementadas com nitrato ou amônio na concentração de 4 mM de N, a atividades das enzimas da assimilação de N (nitrato redutase e glutamina sintetase), apresentaram maior atividade nas folhas, enquanto que na raiz a atividade da enzimas foi suficiente para assimilar a maior parte do N absorvido (BIGGES, 2003).

Este resultado coincide com de (SILVEIRA, 1981) que constatou ao estudar o efeito das proporções de nitrato/amônio em (*Panicum maximum* Jacq.) cultivado em solução nutritiva, baixa atividade da NR na raiz correlacionada com maiores teores de nitrato/amônio nesse órgão/tecido. Para ANDRADE (1994) estudando o mesmo genótipo, observou que a atividade da NR em raiz e parte aérea foi estimulada até a proporção de 50/50 de nitrato/amônio, diferindo do comportamento apresentado pelas variedades de cana-de-açúcar neste estudo, pois observamos atividade significativa da NR mesmo na proporção $25\text{NO}_3^- / 75\text{NH}_4^+$ (Figura 8).

É interessante notar que nas maiores proporções de nitrato, a variedade IACSP95-5000 apresenta maiores atividades da NR nas folhas e colmos, ao passo que a variedade RB867515 possui maior atividade nas raízes (Figura 8). Esse resultado pode indicar um metabolismo de N mais intenso nas raízes da RB867515 que possui melhor desempenho em solos de baixa fertilidade, possivelmente devido a um sistema radicular mais desenvolvido.

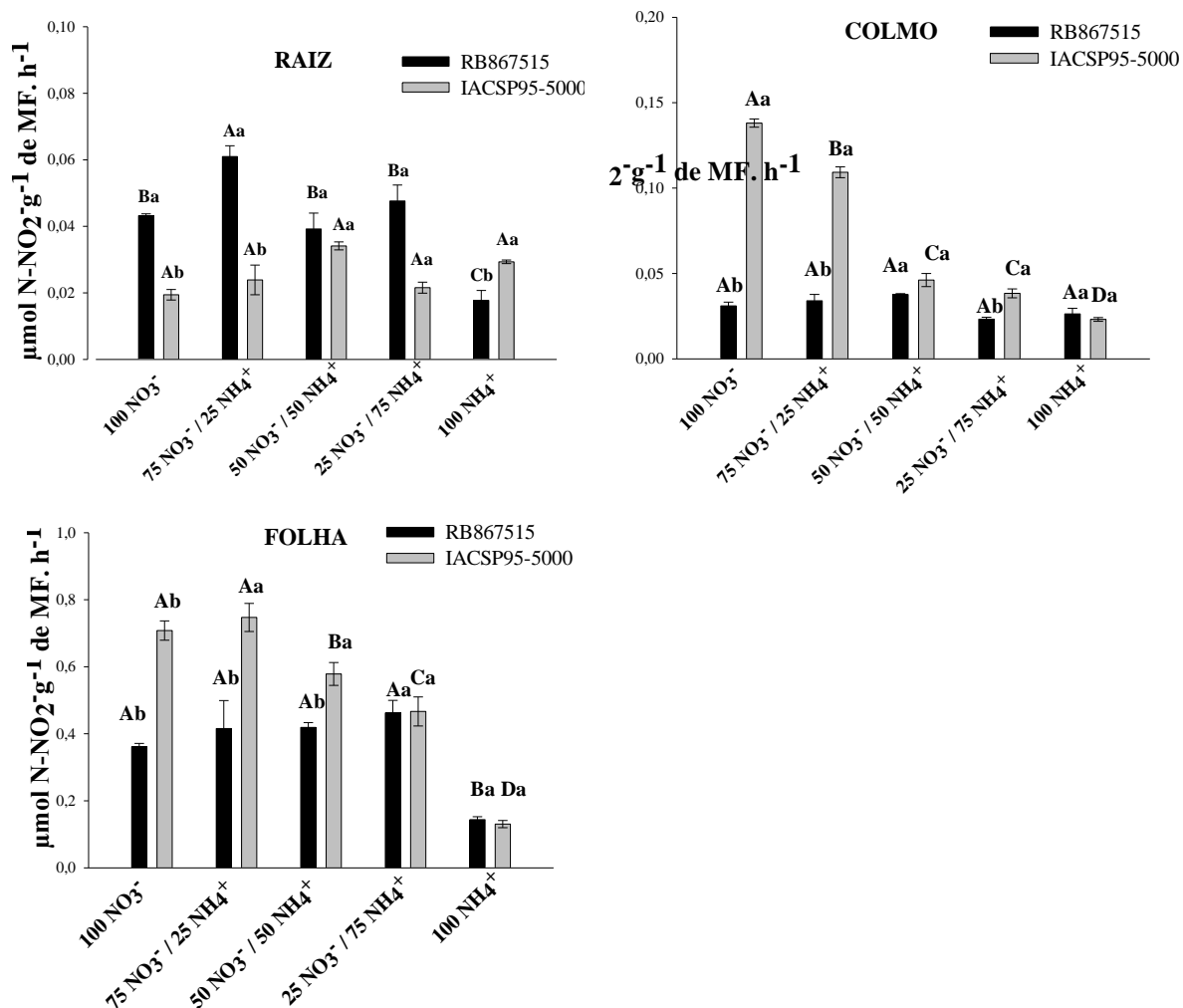


Figura 8. Atividade da Nitrato Redutase ($\mu\text{moles N-NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}$ de massa fresca. h^{-1}) da raiz, colmo e folha de duas variedades de cana-de-açúcar, suplementadas com diferentes fontes e proporções de N. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os tratamentos e variedades, respectivamente pelo teste de Scott-Knott a 5%, $n=4$

4.2.7 Concentração total de N

Pode-se observar que não houve diferença significativa na concentração total de N nos diversos tecidos/órgãos das plantas e entre as variedades (Figura 8). Esses resultados indicam que em cana-de-açúcar a suplementação de proporções de nitrato e amônio não interfere no N total das plantas. Entretanto, o cultivo dessas plantas foram realizadas em solução nutritiva com 3 mM de N, ou seja, não houve variação na disponibilidade de N, o que pode justificar este resultado.

No entanto, em cana-de-açúcar cultivada em condições contrastantes de disponibilidade de N o efeito pode ser significativo no acúmulo de N, como encontrado por

(SEREZINO, 2015) que estudou o processo de remobilização em cana-de-açúcar sob deficiência de N e alto N (5 mM $\text{NH}_4^+\text{NO}_3^-$) por 10 dias. Este autor demonstrou que os tratamentos contrastantes de disponibilidade de N foram efetivos para alterar a homeostase de N nos órgãos de cana-de-açúcar partir dos 5 dias. GIBBS (2003) estudando efeito do nitrato e amônio em concentrações crescentes de N constatou que em raiz e folha o acúmulo foi relativamente constante, mas no colmo aumentou. Portanto, isso evidencia que a concentração de N em órgãos de cana-de-açúcar varia quando são submetidas em condições contrastantes de N, e que a forma amoniacal ou nítrica não influencia no acúmulo.

SILVEIRA; CROCOMO, (1990) verificaram que em cana-de-açúcar sob elevada fertilização nitrogenada houve maior acúmulo de N e maior atividade da NR para o tratamento com 450 kg ha⁻¹ de N em relação ao tratamento controle (sem fertilização nitrogenada) nas fases iniciais da cultura, e que após este período os teores de N foliares decresceram, mostrando que a cana-de-açúcar apresentou uma elevada capacidade de absorção, redução do nitrato e assimilação de amônio nas fases iniciais de desenvolvimento.

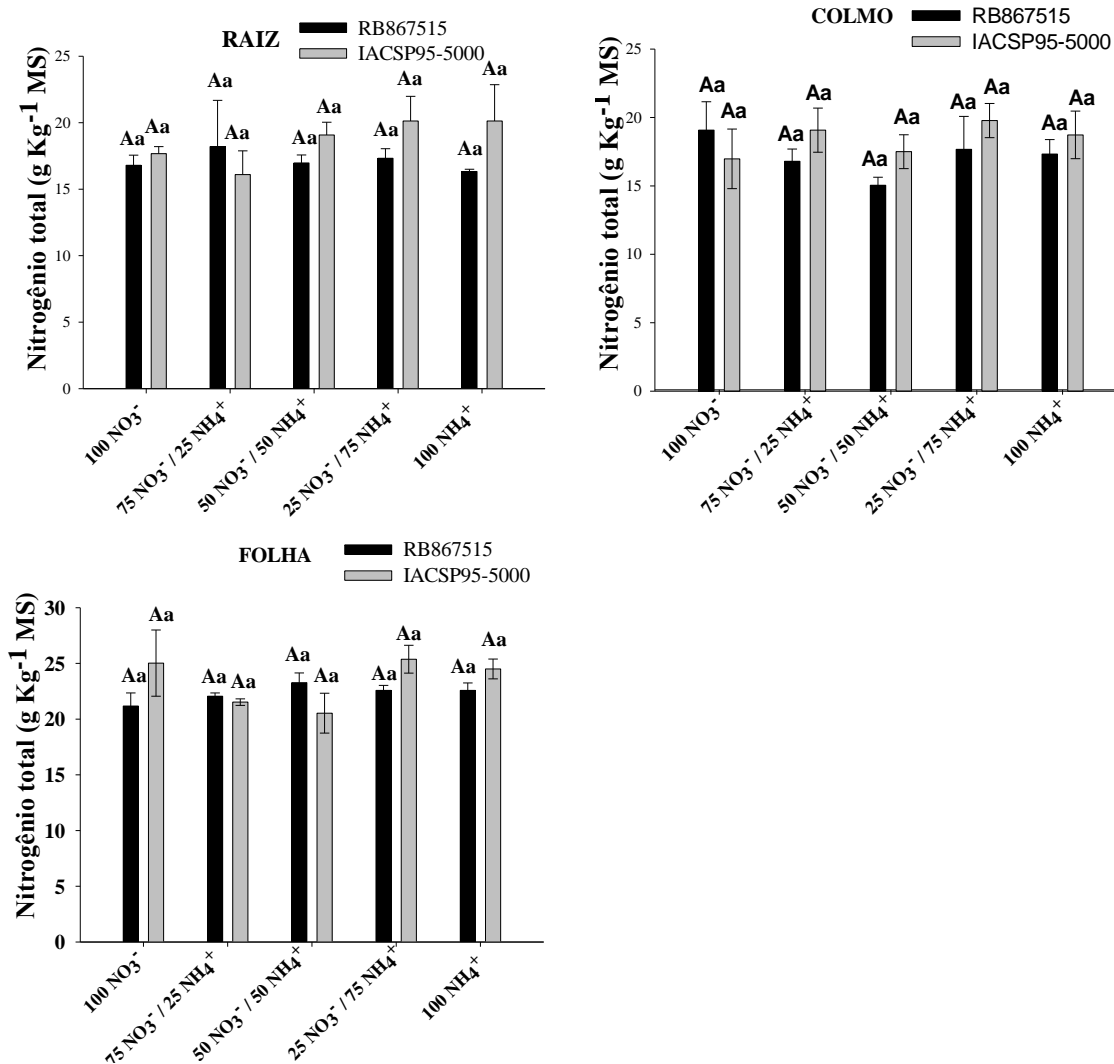


Figura 8. Nitrogênio total (g Kg^{-1} MS) da raiz, colmo e folha de duas variedades de cana-de-açúcar, suplementadas com diferentes fontes e proporções de N. Letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os tratamentos e variedades, respectivamente pelo teste de Scott-Knott a 5%, $n=4$.

4.3 Absorção de nitrogênio em variedades contrastantes de cana-de-açúcar inculadas ou não com bactérias diazotróficas – Experimento II

4.3.1 Absorção de nitrato e amônio

Nitrato é a forma inorgânica de N mais abundantes em solos agricultáveis, mas devido a sua forma aniônica é fracamente adsorvido pelos colóides do solo, apresentando alta mobilidade no perfil e sujeito ao processo de lixiviação. Além disso, em solos mal drenados ou em sítios de anaerobiose o nitrato pode ser perdido por desnitrificação devido a atividade de alguns microrganismos do solo (MILLER et al, 2007). Estudos de composição de N em

solos cultivados com cana-de-açúcar realizados por ROBINSON et al. (2011) demonstraram que o aumento da concentração de nitrato são resultados da alta taxa de nitrificação do amônio e da sua baixa aquisição pelas plantas. O transporte de nitrato para dentro das células radiculares é regulado por uma família multigênica chamada NRT (*NITRATE TRANSPORTERS*). O sistema de absorção de nitrato depende da concentração de N no solo e pode ser de baixa afinidade (*Low Affinity Transporter System* ou LATS) acima de 1 mM, ou alta afinidade (*High Affinity Transporter System* ou HATS) concentração de 1 μ M - 1mM, induzido pela presença de nitrato (iHATS) e constitutivo (cHATS) (CRAWFORD; GLASS, 1998).

O amônio é forma preferencial de absorção de N pelas raízes de cana-de-açúcar quando comparada a nitrato (ROBINSON et al, 2011 ; SEREZINO, 2015), entretendo a sua assimilação é rápida devido à toxicidade que causa às células (RAVEN, et al, 2005). A absorção de amônio é feita por um sistema bifásico. Quando os níveis de amônio no meio externo (solução nutritiva ou solução do solo) são baixos, opera o sistema de absorção de alta afinidade (HATS). Em concentrações elevadas de amônio no meio externo entra em funcionamento o sistema de baixa afinidade (LATS), sendo a concentração de 1 mmol L⁻¹ de amônio o limite abaixo do qual opera o sistema de alta afinidade (HATS), e acima do qual opera o sistema de baixa afinidade (LATS) (FERNANDES et al., 2006).

Assim, entender o processo de absorção de nitrato e amônio em associação com bactérias diazotróficas é fundamental para compreender os efeitos destes microrganismos sobre a eficiência do uso de N. Com objetivo de estudar o processo de aquisição de nitrato e amônio em raízes de cana-de-açúcar, plantas das variedades “IACSP95-5000” e “RB867515” foram inoculadas com bactérias diazotróficas e suplementadas com nitrato e amônio na concentração de 3mM de N por 40 dias. Em seguidas as plantas foram divididas em dois grupos de tratamentos nas concentrações de (25, 75, 150 e 300 μ M de K¹⁵NO₃ a 60 % em átomos de ¹⁵N, por um período de 20 min) e a outro (25, 75, 150 e 300 μ M de ¹⁵NH₄SO₄⁺ a 98 % em átomos de ¹⁵N, por 10 min).

Em relação às plantas submetidas ao K¹⁵NO₃ foi observada diferença no acúmulo de nitrato nas raízes entre as variedades quando foram inoculadas. Na ‘IACSP-95-5000’, o acúmulo de nitrato para cada concentração de N: 25 75, 150 e 300 μ M K¹⁵NO₃ foram (1,47; 4,04; 3,56 e 5,69 μ mol de N g⁻¹ de MS h⁻¹), enquanto que na ‘RB867515’ o acúmulo foi (1,32; 2,16; 2,66 e 3,02 μ mol de N g⁻¹ de MS h⁻¹), respectivamente. Nas variedades não inoculadas, não houve diferença significativa no acúmulo de nitrato. Esses resultados demonstram que a inoculação resulta em maior a eficiência na absorção de nitrato na variedade ‘IACSP95-5000’ quando

comparada a ‘RB867515’ (Figura 10). Em plantas de *Arabidopsis thaliana* foi observada indução da expressão genes da família de transportadores de nitrato NRT2 em associação com rizobactéria *Phyllobacterium brassicacearum* (KECHID et al., 2013). Assim, há indícios que as bactérias diazotróficas/promotoras de crescimento aumentam a eficiência de aquisição de nitrato e que a resposta difere entre variedades, como foi observado neste estudo.

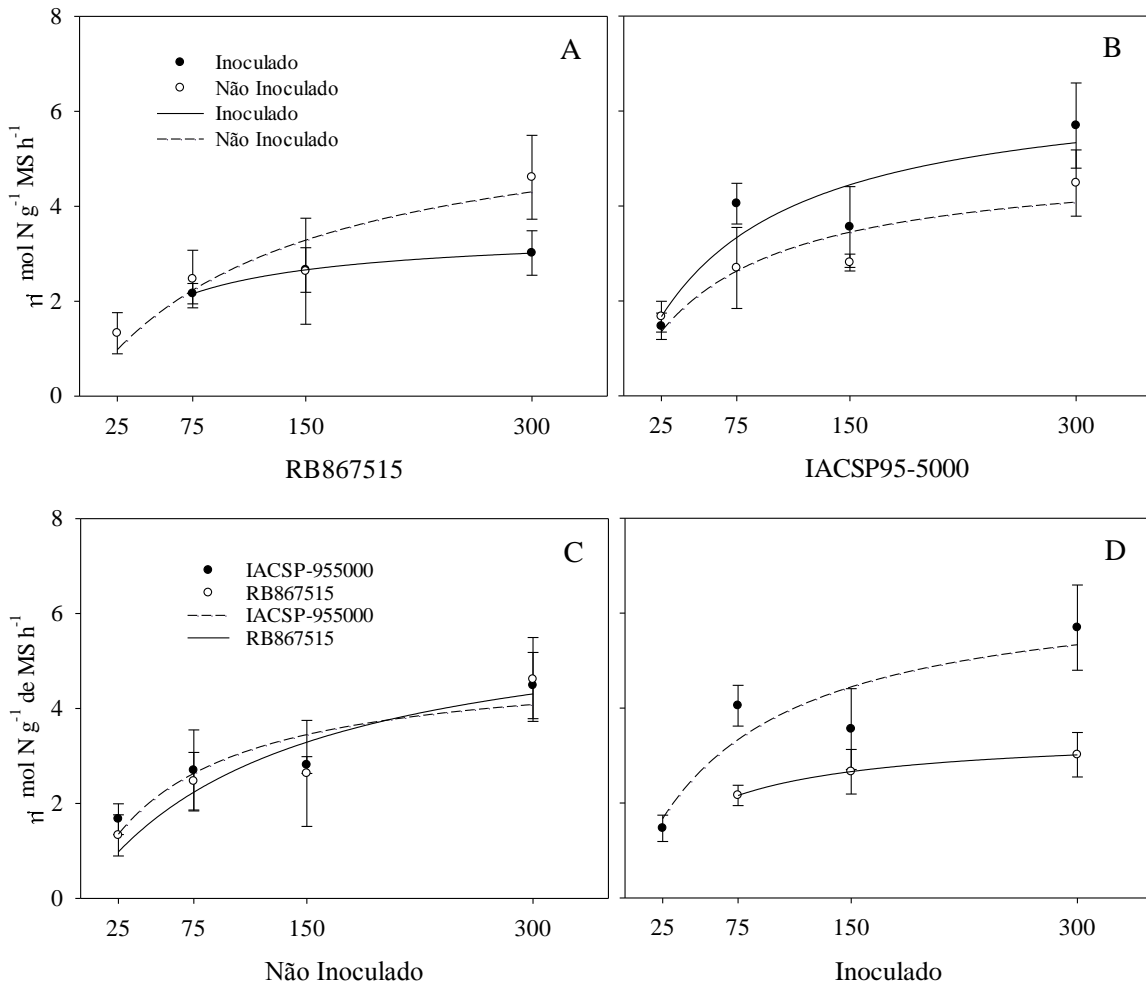


Figura 10. Acúmulo de $^{15}\text{N-NO}_3^-$ em raízes de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. Amostras de raízes foram coletadas e analisadas para a concentração de N derivado do fertilizante (K^{15}NO_3), $n=4$.

Nas plantas submetidas ao tratamento com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foram observadas diferenças significativas no acúmulo de amônio em raízes das variedades quando inoculadas ou não bactérias diazotróficas. Na ‘RB867515’ inoculada, foi a que apresentou maior acúmulo de amônio (35,63 ; 45,74 ; 44,63 e 46,73 $\mu\text{mol de N g}^{-1}$ de MS h^{-1}) comparada a não inoculada (33,08 ; 35,35 ; 40,56 e 43,17 $\mu\text{mol de N g}^{-1}$ de MS h^{-1}). Na ‘IACSP95-5000’ inoculada, o maior acúmulo foi na concentração 300 $\mu\text{mol de N}$ (48,59 N g^{-1} de MS h^{-1}). Comparando as

variedades inoculadas, a ‘RB867515’ apresentou maior acúmulo de amônio nas concentrações 25, 75 e 150 $\mu\text{mol N}$ em relação a ‘IACSP95-5000’. Nas variedades não inoculadas, não houve diferença significativa no acúmulo de amônio (Figura 11).

Em raízes de tomate inoculadas com uma cepa tipo selvagem de *Azospirillum brasilense*, foi observada indução do gene *LeAmt1.2* que codifica um transportador de amônio, dando indícios de que o amônio pode desempenhar um papel de sinalização nas interações entre bactérias e as plantas (BECKER et al., 2002). Além disso, foi observado em indução transcricional de um transportador de amônio *Sc AMT1.1* quando inoculada com as cinco estipes do inoculante da cana-de-açúcar (*Gluconacetobacter diazotrophicus*; *Herbaspirillum seropedica*; *Herbaspirillum rubrisubalbicans*; *Paraburkholderia tropica* e *Nitrospirillum amazonense*) revelando maior absorção de amônio, por outro lado plantas cultivadas em condições controladas por 30 dias (*in vitro*), inoculadas apenas com *G. diazotrophicus* apresentou regulação positiva de genes transportadores de nitrato *ScNRT1.1* e *ScNRT 2.1* e amônio *Sc AMT1.1*, o que levou maiores influxos de nitrato e amônio (SOUZA, 2015).

A absorção de N associadas com microrganismos promotores de crescimento é importante para o desenvolvimento das plantas. Informações sobre a aquisição de N inorgânico e a regulação dos transportadores de nitrato e amônio em cana-de-açúcar permanecem escassas. Em experimentos realizados em condições controladas, plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *G. diazotrophicus* apresentaram maior absorção de N (BODDEY et al., 2001; SUMAN et al, 2008), o que demonstra que o processo de transporte de N pode ser regulado pela associação com bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. Desta forma, o aumento da área superficial das raízes e o volume de solo explorado, condicionam a uma maior absorção de nutrientes. Esta evidência é consistente com a observação de plantas inoculadas com *Azospirillum* que absorvem mais macronutrientes (N, P, K) do solo (OKON e VANDERLEYDEN, 1997).

Os mecanismos relacionados ao efeito das bactérias sobre a eficiência na aquisição de N pelas raízes de cana-de-açúcar ainda é pouco estudado. Entretanto, estudos moleculares sinalizam que bactérias diazotróficas em associação com a cana-de-açúcar, podem aumentar a expressão de gene responsável pelo processo de transporte de nitrato na planta. A análise de mais de 260.000 sequências expressas (ESTs – *expressed sequence tags*) a partir de bibliotecas de cDNA de vários tecidos/órgãos em diferentes estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar presente no banco SUCEST - *Sugarcane EST Projec* tem evidenciado que existe relação entre bactéria diazotróficas com a nutrição das plantas (VETTORE et al.,

2003). Portanto, já foram identificados em análises de bibliotecas de cDNA transportadores de nitrato sendo expressos em de cana-de-açúcar induzidos pela inoculação com *H. rubrisulbalbicans* (NOGUEIRA et al., 2001).

Os resultados encontrados nesse trabalho mostram que as variedades apresentam respostas diferentes quando inoculadas em relação à nutrição nítrica ou amoniacal. Verificamos que quando inoculada, a variedade 'IACSP95-5000' apresenta maior influxo/acúmulo de nitrato nas raízes, ao passo que a variedade 'RB867515' também inoculada apresenta maior influxo/acúmulo de amônio (Figura 11). Além disso, é possível observar que as plantas apresentaram maior taxa de absorção de amônio quando comparada a nitrato, o que caracteriza uma maior velocidade de influxo desse nutriente comparado ao nitrato. Alguns autores atribuí esse comportamento a uma preferência da cana-de-açúcar ao amônio (ROBINSON et al, 2011; SEREZINO, 2015).

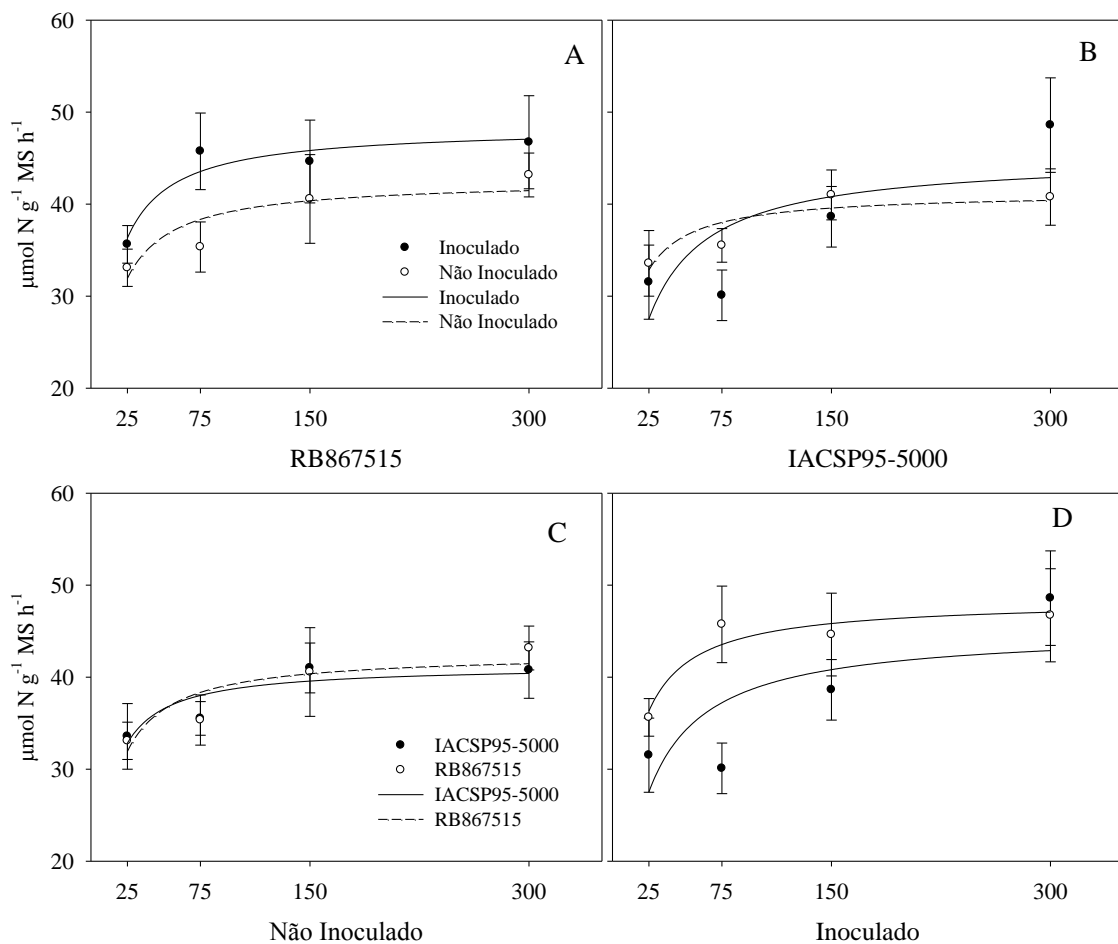


Figura 11. Acúmulo de ^{15}N -amônio em raízes de cana-de-açúcar inoculadas ou não com bactérias diazotróficas. Amostras de raízes foram coletadas e analisadas para a concentração de N derivado do fertilizante ($^{15}\text{NH}_4\text{SO}_4$), $n=4$.

5. CONCLUSÕES

- A variedade 'RB867515' apresentou maior incremento de biomassa seca nas maiores proporções de NH_4^+ comparada a 'IACSP95-5000'.
- Apesar de diferenças no acúmulo de biomassa, as proporções de nitrato e amônio não influenciaram os parâmetros biométricos avaliados nas duas variedades estudadas.
- Na parte aérea, a 'IACSP95-5000' acumulou mais nitrato e apresentou maior atividade da NR.
- As variedades apresentaram maiores acúmulo de amônio e N-amino em raízes.
- As bactérias diazotróficas melhoraram a absorção de nitrato e amônio na 'IACSP95-5000' e 'RB867515', respectivamente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aumentar a eficiência de absorção de nitrato em solos cultivados com cana-de-açúcar por meio da utilização de bactérias promotoras de crescimento/diazotróficas pode conferir uma vantagem na sustentabilidade da produção da cultura. Com base nisso, é necessário ainda avançar os estudos para entender quais os mecanismos fisiológicos, moleculares e bioquímicos envolvidos na absorção de N pela cana-de-açúcar quando são inoculadas com bactérias diazotróficas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS (APTA). 2016. Censo realizado pelo IAC identifica variedades de cana predominantes na região Centro-Sul do Brasil. Disponível em < http://apta.sp.gov.br/noticia_apta.php?id=5078> Acesso em: Fevereiro de 2017.
- ALMEIDA, D. L. de; RIBEIRO, R. L. D.; GUERRA, J. G. M. Sistema de produção agroecológico (“Fazendinha” Agroecológica Km 47). In: **II Simpósio de Agricultura Orgânica; I Encontro de Agricultura orgânica**, Guaíba, p.77-94, 1999.
- ALVALCANTE, V.A.; DÖBEREINER, J. A new acid tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant and Soil**, v.108, p.23-31, 1988.
- ANDRADE, S. R. M. Efeito da proporção $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ na composição da fração nitrogenada e na atividade das enzimas de redução e assimilação de nitrogênio em plantas de capim-Colômbia (*Panicum maximum* Jacq). Viçosa, 1994. 49p. **Dissertação** (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa.
- ANGHINONI, I. Morfologia de raízes e cinética de absorção de nutrientes em diversas espécies e genótipos de plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. p. 355-361, 1989.
- ARALDI, R. **Avaliação da absorção do Amicarbazone e Intoxicação em cana-de-açúcar e plantas daninhas**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- ARMAS, R.; VALADIER, M. H., CHAMPIGNY, M. L.; LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **J. Plant Physiol**, v. 140, p. 531-535, 1992.
- ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, v.35, p.231-237, 2002.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.V. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiol**, p.1124-1133, 1992.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; RAINS, D.W. Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots. **Plant Physiol**. v 112. 1167-1175, 1996.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, R. S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.922-928, 1997.
- BASSIRIRAD, H. Kinetics of nutrient uptake by roots: responses to global change (review). **New Phytologist**, Lancaster, UK, v. 147, p. 155-169, 2000.
- BEATTY, P. H.; ANBESSA, Y.; JUSKIM, P.; CARROLL, R. T.; WANG, J.; GOOD, A. G. Nitrogen use efficiencies of spring barley grown under varying nitrogen conditions in the field and growth chamber. **Ann Bot**, v.105. p.1171–1182, 2010.
- BEATTY, P. H.; ANBESSA, Y.; JUSKIW, P.; CARROLL, R.T, WANG, J.; GOOD, A. G. Nitrogen use efficiencies of spring barley grown under varying nitrogen conditions in the field and growth chamber. **Ann Bot**, 105:1171–1182, 2010.
- BECKER, D.; STANKE, R.; FENDRIK, I.; FROMMER, W. B.; VANDERLEYDEN, J.; KAISER, W. M.; HEDRICH, R. Expression of the NH_4^+ -transporter gene *LEAMT1;2* is

induced in tomato roots upon association with N₂-fixing bacteria. **Planta**, v. 215, p. 424–429, 2002.

BIGGS, I. M. **An investigation of sugarcane nitrogen physiology: sources, uptake and metabolism**, 2003.139f. Ph. D. thesis (Philosophy) – School of Life Sciences, The University of Queensland, Brisbane, Australia, 2003.

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**, Sidney, v. 28, p. 889-895, 2001.

BRAUER, E. K.; SHELP, B. J. Nitrogen use efficiency: re-consideration of the bioengineering approach. **Botany**, v. 88:103–109, 2010.

BRITTO, D. T.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; KRONZUCKER, H. J. Futile Transmembrane NH₄⁺ Cycling: A Cellular Hypothesis to Explain Ammonium Toxicity in Plants. **National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 7, p. 4255-4258, 2001.

BURNS, I. G.; WALKER, R. L, MOORBY; JOORBY, J. How do nutrients drive growth? **Plant Soil**, v.196:321–325, 1997.

CAMARGO, A.M.P., CASER, D. V.; CAMARGO, F. P.; OLIVETTE, M. P. A.; SACHS, R. C. C.; TORQUATO, S. A. Dinâmica e tendência da expansão da cana-de-açúcar sobre as demais atividades agropecuárias. **Informações econômicas**, v.38, p.47-61, 2008.

CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase structure finction and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.580, p. 277-303, 1999.

CAMPOS, C. C. N .S. Silício e excesso de amônio e de nitrato em plantas de cana-de-açúcar e pepino. 2013. 72 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia – Ciência do solo). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP, 2013.

CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, US, v.6. p.853-855, 1975.

CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, R.; MUÑOS, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃-uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, P. 262-271, 2001.

CHALKER-SCOTT, L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. **Photochemistry and Photobiology**, v.70, p.1–9, 1999.

CHAPMAN L.S.; HALSALL, D.M.; GIBSON A.H. Biological nitrogen fixation and sugarcane. **Proceedings of the Australian Sugar Cane Technologists**. V.14, p. 90-93, 1992.

CHEREL, I.; MARION, P. U A.; MEYER, C.; ROUZE, P. Immunological comparisons of nitrate reductases of different plant species using monoclonal antibodies. **Plant Physiology**, v. 81, p. 376-378, 1986.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_08_13_15_58_44_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_15-16.pdf> Acesso em 10 de janeiro de 2017.

- CRASWELL, E. T.; GODWIN, D. C. The efficiency of nitrogen fertilizers applied to cereals grown in different climates. **In Advances in Plant Nutrition** (Vol. 1) (Tinker, P.B. and Lauchli, A., eds), p.1–55, 1984.
- CRAWFORD, N, GLASS, A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 389–395, 1998.
- DE ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; FRACHISSE, J. M.; THOMINE, S.; GAMBALE, F.; BARBIER-BRYGOO, H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. **Nature**, London, v. 442, n. 7105, p. 939-942, 2006.
- DIAZ, C.; SALIBA-COLOMBANI, V.; LOUDET, O.; BELLUOMO, P.; MOREAU, L.; DANIEL, V. F.; MOROT –GAUDRY, J. F.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v.47, p.74–83, 2006
- DILLEWIJN, C. Botany of sugar cane. Walthen: **Chronica Botanica**, 1952. p.136-141. 359p.
- DING, L, WANG, K. J, JIANG, G. M.; BISWAS, D. K.; Xu, H, Li, L. F, Li, Y. H. Effects of nitrogen deficiency on photosynthetic traits of maize hybrids released in different years. **Annals of Botany**, 96, 925–930, 2005.
- DÖBEREINER, J.; RUSCHEL, A. P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. **Revista de Biologia**, v. 1: 261-272, 1958.
- DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A.G.; SOUZA, E.S.; FRANÇA, J.G.E. Metabolismo de plantas de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes concentrações de nitrogênio. **Pesq. Agrop.brasil**, v. 38, p. 1373-1379, 2003.
- EPSTEIN, E.; JEFFERIES, R. L. The genetic basis of selective ion transport in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Boca Raton, v.15, p.162-184, 1984.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **World Fertilizer Trends and Outlook to 2018**. 2015. 53f. Roma, 2015.
- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, 1980.
- FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Org) **Nutrição Mineral de Plantas. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, 2006.
- FORDE, B. G.; CLARKSON, D. T. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. **Adv Bot Res**, v.30:1–90, 1999.
- FREITAS, R. P. Bactérias diazotróficas endofíticas associadas à cana-de-açúcar. 2011. 81f. **Dissertação** (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical /Gestão de Recursos Agroambientais). Instituto Agronômico de Campinas, IAC, Campinas, SP, 2011.
- GASTAL, F.; LEMAIRE, G. N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 789-799, 2002.
- GLASS, A. D. M. Ion absorption and utilization: the cellular level. In: BALIGAR, V. C.; DUNCAN, R. R. (Ed.). **Crops as enhancers of nutrient use**. San Diego: Academic Press. p. 41-64, 1990.
- GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y. Nitrogen Absorption by Plant Roots; In H. S. Srivastava and R. P. Singh. **Nitrogen Nutrition in Higher Plants. Associated Pub. Co.** New Delhi. p.21-56, 1995.

- GODFRAY, H. C. J.; BEDDINGTON, J. R.; CRUTE, I. R.; HADDAD, L.; LAWRENCE, D.; MUIR, J. F.; PRETTY, J.; ROBINSON, S.; THOMAS, S. M.; TOULMIN, C. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. **Science**, v.327, p.812-818, 2010.
- GOOD, A. G., SHAWAT, A.; MUENCH, D. Can less yield more? Are reducing nutrient inputs into the environment compatible with crop production? **Trends Plant Sci**, v.9. p.597–605, 2004.
- GOOD, A. G.; JOHNSON, S. J, DE PAUW, M, et al. Engineering nitrogen use efficiency with alanine aminotransferase. **Canadian Journal of Botany**, v.85: p.252–262, 2007.
- GRANSTEDT, R. C, HUFFAKER, R. C. Identification of the leaf vacuole as a major nitrate storage pool. **Plant Physiol**, 70: p.410–413, 1982.
- GROF, C.P.L.; CAMPBELL, J.A. Sugarcane sucrose metabolism: scope for molecular manipulation. *Australian Journal of Plant Physiology*, Melbourne, v. 28, p. 1-12, 2001.
- HAJARI, E.; SNYMAN, S. J, WATT, M. P . Inorganic nitrogen uptake kinetics of sugarcane (*Saccharum spp.*) varieties under in vitro conditions with varying N supply. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, p.361–371, 2014.
- HAJARI, E.; SNYMAN, S. J, WATT, M. P. Nitrogen use efficiency of sugarcane (*Saccharum spp.*) varieties under in vitro conditions with varied N supply. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, p.361–371, 2015.
- Ho, C. H.; Lin, S. H.; Hu, H. C, Tsay, Y. F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v.138, 1184–1194, 2009.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, v.347, p.1-32, 1950.
- HODGE, A. et al. Are microorganisms more effective than plants at competing for nitrogen. **Trends Plant Sci**, v.5, p.304–308, 2000.
- HOFFMANN, H.P.; SANTOS, E.G.D.; BASSINELLO, A. I.V., VIEIRA, M. ANTONIO, S. **Variedades RB de cana-de-açúcar**. 1ª Ed. Araras: CCA-UFSCar, p. 30, 2008.
- IMSANDE, J.; TOURAINÉ, B. N demand and the regulation of nitrate uptake. **Plant Physiol**, v. 105: p.3–7, 1994.
- JAVORSKY, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research**. Communication, v.43. p.1274-1279, 1971.
- KANT, S.; YONG-MEI Bi.; ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v.62, p.1499–1509, 2010.
- KAUR S., KANWAR, R. S.; ONKAR , S. Seasonal variation in nitrate reductase activity and tillering in sugarcane genotypes. **Indian Journal of Plant Physiology** 35,162-166, 1992.
- KECHID, M.; DESBROSSES, G.; ROKHSI, W.; VAROQUAUX, F.; DJEKOUN, A.; TOURAINÉ, B. The NRT2.5 and NRT2.6 genes are involved in growth promotion of Arabidopsis by the plant growth-promoting rhizobacterium (PGPR) strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196. **New Phytologist**, London, v.198, p. 514-524, 2013.
- KINGi, B. J, SIDDIQI, M. Y.; RUTH, T. J, WARNER, R. L, GLASS, A. D. M. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots by nitrate, nitrite, and ammonium. **Plant Physiol**, v.102: p.1279–1286, 1993.

- KRONZUCHER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Compartmentation and flux characteristics of ammonium in spruce. **Planta**, P691-698, 1995.
- KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Kinetics of NH₄ influx in spruce. **Plant Physiol**, v 110. p. 773-779, 1996.
- KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH, A.; PERRINE-WALKER, F.; MALINSKA, K.; MOUNIER, E.; HOYEROVA, K.; TILLARD, P.; LEON, S.; LJUNG, K.; ZAZIMALOVA, E.; BENKOVA, E.; NACRY, P.; GOJON, A. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for sensing in plants. **Development Cell**, Cambridge, v 18, n. 6, p. 927-937, 2010.
- LAM, H. M.; COSCHIGANO, K. T.; OLIVEIRA, I. C.; MELLO-OLIVEIRA, R.; CORUZZI, G. M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* v.47, p.569–593, 1996.
- LARSSON, C.M; INGERMARSSON, B. Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In: Molecular and genetic aspect of assimilation. **Oxford Science Publ**, p. 4-44.
- Li R.P. and MACRAE, I. C. Specific association of diazotrophic *acetobacter* with sugarcane. **Soil Biol. Biochem.**v.23, 999-1002, 1991.
- Li R.P.; MACRAE, I. C. Specific identification and enumeration of *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane. **Soil Biol. Biochem.** v. 24, 413-419, 1992. low temperatures, 1991.
- LUDEWIG, U.; WILKEN, S. Homo- and heterooligomerization of ammonium transporter-1 NH₄ uniporters. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, 456–468, 2003.
- MALAVOLTA, E. Tendências no uso de fertilizantes na América Latina – principio e perspectivas. **Anais E.S A. ESALQ, USP.** p. 657 – 669, 1975.
- MAPA. Cana-de-Açúcar. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>> Acesso em 10 de janeiro de 2017.
- MARQUES, J.R, R. B. M.; CANELLAS, L. P.; SILVA, L. G.; OLIVARES, F. L. Promoção de enraizamentos de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e de bactérias diazotróficas endofíticas. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.32, p.1121-1128, 2008.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. **Academic Press**. 2 ed. Cambridge, 1995.
- Martins, P. O. Cinética de absorção de silício por cultivares de cana-de-açúcar. 2010. 64f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Ann Bot**, v.105. p.1–17, 2010.
- MATTSSON, M.; SCHJOERRING, J.K. Dynamic and steady-state responses of inorganic
- MILLER, A. J.; FAN, X. R.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELL, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, 2297–2306, 2007.
- MOLLO, R. H.; KAMPRATH, E. J.; JACKSON, W. Analysis and interpretation of factors which contribute to efficiency of nitrogen utilization. **Agron J.** v.74:562–564, 1982.

- MOOSE, S.; BELOW, F. E. Biotechnology approaches to improving maize nitrogen use efficiency. In: Kriz AL, Larkins BA (eds) Molecular genetics approaches to maize improvement. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol 63. Springer, Berlin, p.65–77, 2009.
- MOOSES, BELOW, F. E. Biotechnology approaches to improving maize nitrogen use efficiency. In: Kriz AL, Larkins BA (eds) Molecular genetics approaches to maize improvement. **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Springer, Berlin, v.63 p.65–77, 2009.
- MOREITA, F. M. S.; SILVA, K.; ABRAHÃO, R. S. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**. p.74-99, 2010.
- MURPHY, K. M.; MACRAE, I. C. Nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of sugarcane in Tropical Queensland. **Proceedings of the Australian Society Sugar Cane Technologists** . v. 7, p.276-284, 1985.
- MUTHUKUMARASAMY R., REVATHI G.; LAKSHMINARASIMHAN. C 1999 Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. **Biology and Fertility of Soils**. 29,157-164.
- NAMBIAR, P.T.C.; REGO, T.J.; RAO, B.S. Nitrate Concentration and Nitrate Reductase Activity in the Leaves of Three Legumes and Three Cereals. **Ann. Appl. Biol**, v. 112, p. 547-553, 1988.
- NERONI, R.F.; CARDOSO, E. J. B.N. Occurrence of diazotrophic bacteria in *Araucaria angustifolia*. **Scientia Agricola**, 64: 303-304, 2007.
- NEVES, M.F.; TROBIN, V. G.; CONSOLI, M. O mapa sucoenergético do Brasil. In: SOUZA, E.L.L.; MACEDO, I. (Org.). **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética**. São Paulo: LUC Projetos de Comunicação (Editora), Cap. 2, p.14 – 43, 2010.
- NIELSEN, N. E.; BARBER, S. A. Differences among genotypes of corn in the kinetics of P uptake. **Agronomy Journal**, Madison, v. 70, p. 695-698, 1978.
- NOGUEIRA, E.M.; VINAGRE, F.; MASUDA, H.; VARGAS, C.; PADUA, V.L.M.; SILVA, F.R.; SANTOS, R.V.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Expression of sugarcane genes induced by inoculation with *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum rubrisubalbicans*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, p. 199-206, 2001.
- OKON, Y.; VANDERLEYDEN, J. 1997. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. **ASM News**, v. 63, p. 366-370.
- OLIVARES, F.L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar por bactérias diazotróficas do gênero *Herbaspirillum*. **Tese** (Doutorado em ciências do solo) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 1997.
- OLIVEIRA, A. L. M .; URQUIAGA, S.; DOBEREINER, J.; BALDANI, J. I. The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 241, p. 205-215, 2002.
- OLIVEIRA, A.L.M.; CANUTO, E. L.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I. Yield of micropagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, v. 284, p.23-32, 2006.
- ONKAR, S.; KANWAR, R. S. SINGH, O. Enzymes ripening of sugar cane at

- ONO, K.; TERASHIMA, I.; WATANABE, A. Interaction between nitrogen deficit of a plant and nitrogen content in the old leaves. **Plant and Cell Physiology**, 37, 1083–1089, 1996.
- ONU. Organização das Nações Unidas. Uso global de fertilizantes passará de 200 milhões de toneladas em 2018 Disponível em: <<http://www.unmultimedia.org/radio/portuguese/2015/02/fao-uso-global-defertilizantes-passara-de-200-milhoes-de-toneladas-em-2018/#.VfdzV9Kqqko>> Acesso em 10 de Janeiro de 2017.
- PARISH, D. H. The amino acids of sugar cane. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, v. 12, p.1666-1670, 1967.
- PARISH, D. H. The amino acids of sugarcane. I. The amino acids of can juice and the effect of nitrogenous fertilisation on the levels of these substances. **J. Sci. Fd Agric**, v. 16, p. 240-242, 1965.
- PARISH, D. H. The composition of cane juice: I The amino-acid and nitrogen contents of cane juice. Nutrition and Soils. **Reports of the Mauritius Sugar Industry Research Institute**, p. 29-35, 1956.
- PEOPLES, M. B. Minimizing gaseous losses of nitrogen. **In Nitrogen Fertilizer in the Environment** (Bacon, P.E., ed.), pp. 565–606, 1995.
- PEREIRA, W. Produtividade e Qualidade Tecnológica da Cana-de-açúcar Inoculada com Bactérias Diazotróficas. 2011. 61f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.
- PURCINO, A.A.C., MAGNAVACA, R., MACHADO, A.T., Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v.6, n.1, p.41-46, 1994.
- RAI, R. K.; SHRIVASTAVA, A. K.; GHOSH, A. K.; SAXENA, Y.R. Variation in nitrate reductase activity by various sources of nitrogen in earlier stages of growth in sugarcane. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 31, p. 200-204, 1988.
- RAVEN, J.; ANDREWS, M.; QUIGG, A. The evolution of oligotrophy: implications for the breeding of crop plants for low agricultural systems. **Ann App Biol**, v. 146, p. 261-280, 2005.
- REIS, J. F.B., Reis, V, M.; URQUIAGA, S.; DOBERENER, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant and Soil**, v.219,p.153-159, 2000.
- ROBINSON, N.; FLETCHER, A.; WHAN, A.; CRITCHELY, C, VON WIRÉN, N, LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Sugarcane genotypes differ in internal nitrogen use efficiency. **Funct Plant Biol**, v.34:p.1122–1129, 2007.
- ROTHSTEIN, S. J. Returning to our roots: making plant biology research relevant to future challenges in agriculture. **The Plant Cell**, 19, 2695–2699, 2007.
- RUEDA-LOPEZ, M, CRESPILO, R.; CANOVAS, F. M.; AVILA, C. Differential regulation of two glutamine synthetase genes by a single Dof transcription factor. **The Plant Journal**. p.73–85, 2008.
- SANTOS, L. A. Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a eficiência de uso de nitrogênio em Arabidopsis. 2009. 81f. **Tese** (Doutorado em Agronomia,

Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

SCHENK, M. K.; BARBER, S. A. Phosphate uptake by corn as affected by soil characteristics and root morphology. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 43, p. 880-883, 1979a.

SCHORTEMEYER, M.; STAMP, P.; FEIL, B. Ammonium tolerance and carbohydrate

SEREZINO, L.H.D. Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). 2015. 112f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Meio Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, SP, 2015.

SIDDIQI, M. Y.; KING, B. J.; GLASS, A.D.M. Effects of nitrate, chlorate and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. **Plant Physiol**, 644-650, 1992.

SILVEIRA, J. A. G.; CROCOMO, O. J. Assimilação de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivado em presença de elevado nível de N e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília, v. 2, n. 1, p. 7-15, 1990.

SODEK, L. Metabolismo do Nitrogênio. Em: Kerbauy, G.B.- Fisiologia Vegetal, p. 94-113, 2004.

SOHLENKAMP, C.; SHELDEN, M.; HOWITT, S.; UDVARDI, M. Characterization of *Arabidopsis AtAMT2*, a novel ammonium transporter in plants. **FEBS Lett**, v. 467, 273-278, 2000.

SOHLENKAMP, C.; SHELDEN, M.; HOWITT, S.; UDVARDI, M. Characterization of *Arabidopsis AtAMT2*, a novel ammonium transporter in plants. **FEBS Lett**, v. 467, 273-278, 2000.

SOUZA, L.B. Caracterização fisiológica e do perfil de expressão gênica do transporte de nitrogênio em genótipos contrastante para a fixação biológica de N₂ de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp). 2015. 165f. **Tese** (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) Universidade de São Paulo, SP, 2015.

SOUZA, S. R. et al. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crude protein of rice. *Communication Soil Science and Plant Analyses*, New York, v. 30, n. 5, p. 711-724, 1999.

status in maize cultivars. **Annals of Botany**, Oxford, v. 79, n. 1, p. 25-30, 1997

SUMAM, A.; SHRIVASTAVA, A.K.; GAUR, A.; SINGH, P.; SINGH, J.; YADAV, R.L. Nitrogen use efficiency of sugarcane in relation to its BNF potential and population of endophytic diazotrophs at different N levels. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 54, p.1-11, 2008.

TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄. **UFRGS**. 23p, 1982.

TEÓFILO, T. S. Expansão da cultura da cana-de-açúcar confrontada com o zoneamento agroambiental utilizando análise supervisionada de imagem. 2012. 64f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia/ Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

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

- TOURAINÉ, B. MANTELIN, S. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal Experimental Botany**, v. 55, p. 27-34, 2004.
- Tsay, Y. F.; Chiu C. C, Tsai, C. B.; Ho, C. H.; Hsu, P. K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, 581, 2290–2300, 2007.
- TSAY, Y. F.; SCHROEDER, J. L.; FELDMAMM, K. A.; CRAWFORD, N. M. A herbicide sensitivity gene CHLI gene encodes a nitrate-inducible nitrate transporter, **Cell**, v. 72. 705-713, 1993.
- UDOP. União dos produtores de bioenergia. A História da Cana-de-açúcar - Da Antiguidade aos Dias Atuais. Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=993>> Acesso em 10 de Setembro de 2015.
- ULLRICH, W. R.; LAESSON, M.; LESCH, S.; NOVACKY, A. Ammonium uptake in *Lemna gibba* G1, related membrane potential change and inhibition of onion uptake. **Physiol. Plant**, v 61. 396-376, 1984.
- VAUGHN, K. C.; CAMPBELL, W. H. Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. **Plant Physiology**, v. 88, p. 1354-1357, 1988.
- VIANA, R. S. Efeitos de maturadores químicos aplicados em início de safra na produtividade e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar. 2011. **Tese** (Doutorado em Agronomia-Agricultura). Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu-SP, 2011.
- VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de soja afetados pela interação alumínio-fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p. 91-96, 1984.
- WALSH K.; HARRISON, D. Nitrogen fixation in sugarcane? **Australian Sugarcane** Oct.-Nov. p. 30-31, 1997.
- WANG, M.; SIDDIQI, M. Y.; RUTH, T. J.; GLASS, A. D. M. Ammonium uptake by rice roots. II Kinetics of $^{13}\text{NH}_4$ influx across the plasmalemma. **Plant Physiol**, p.1259-1267, 1993a.
- WICKERT, S.; MARCONDES, J.; LEMO, M. V.; LEMOS, E. .G. M. Nitrogen assimilation in citrus based on CitEST data minig. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.810-818, 2007.
- YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T. Metabolic engineering with *Dof1* transcription factor in plants: **Improved nitrogen**, 2004.
- YEMM, E. W. e COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80.p.209-213, 1955.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.
- YOUNGDAHL, L. J.; PACHECO, R.; STREET, J. J.; VLEK, P. L. G. The Kinetics of ammonium and nitrate uptake by young rice plants. **International Fertilizer Development Center Muscle Shoals**. Alabama, USA. p. 8, 1982.

8. ANEXOS

Tabela 1. Sais utilizados, e suas respectivas concentrações (g/10L), para o preparo da solução nutritiva. Cada proporção (%) corresponde a um tratamento. 1/2FI

Soluções	Sais	100 NO ₃	75NO ₃ 25NH ₄	50NO ₃ 50NH ₄	25NO ₃ 75NH ₄	100 NH ₄
	KNO ₃	2,27	2,27	1,52	0,76	-
	MgSO ₄ .7H ₂ O	2,43	2,43	2,43	2,43	2,43
	CaNO ₃ .2H ₂ O	0,89	-	-	-	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,5	0,99	1,49	1,98
Macronutrientes	KH ₂ PO ₄	0,68	0,68	-	-	-
	K ₂ HPO ₄	-	-	0,87	0,87	0,87
	K ₂ SO ₄	0,21	0,21	0,43	1,08	1,74
	CaSO ₄ .2H ₂ O	2,78	3,42	3,42	3,42	3,42
	MnSO ₄ .2H ₂ O	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	2,86	2,86	2,86	2,86	2,86
	Na ₂ MoO ₄	0,021	0,021	0,021	0,021	0,021
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,079	0,079	0,079	0,079	0,079
	Fe- EDDHMA	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05