# Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Avaliação fisiológica e bioquímica de cana-de-açúcar variedades RB83-5089 e SP80-3280 em fase inicial de crescimento submetidas a doses de nitrato

Olehg Isaac Aguilar Rojas

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

Piracicaba 2012

# Olehg Isaac Aguilar Rojas Engenheiro Agrônomo

# Avaliação fisiológica e bioquímica de cana-de-açúcar variedades RB83-5089 e SP80-3280 em fase inicial de crescimento submetidas a doses de nitrato

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora: Profa. Dra. **HELAINE CARRER** 

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Aguilar Rojas, Olehg Isaac Avaliação fisiológica e bioquímica de cana-de-açúcar variedades RB83-5089 e SP80-3280 em fase inicial de crescimento submetidas a doses de nitrato / Olehg Isaac Aguilar Rojas. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012. 129 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bioquímica vegetal 2. Cana-de-açúcar 3. Fotossíntese 4. Nitrogênio 5. Nutrição vegetal 6. Nitrato I. Título

CDD 633.61 A283a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"

#### **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Antônia e Luis pelo dom da vida, seus sacrifícios e o ensino permanente;

A minha esposa, Susana, e meus dois maravilhosos filhos Oleigdi Susana e Mario Alejandro, por apoiar este e todos os meus esforços e compromissos, por seu amor, energia e compreensão;

Aos meus tios Álvaro e José Luis, só o tempo dirá o que tem sido a sua contribuição para este nobre propósito pessoal e profissional;

A Secretaria Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação do Panamá SENACYT e ao Instituto de Treinamento e Desenvolvimento de Recursos Humanos IFARHU, pelo apoio financeiro e moral, sem o qual não teríamos o presente trabalho;

Ao Ministério do Desenvolvimento Agropecuário do Panamá, MIDA pelo afastamento laboral e o financiamento parcial do meu período de estudo;

Ao povo e ao Estado brasileiro, por essa demonstração de fraternidade e solidariedade para a minha família e para mim;

Ao CAPES pela bolsa recebida numa fase crucial dos meus estudos;

A Universidade de São Paulo USP, em especial a Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", por me aceitar como parte de seus alunos;

A professora e pesquisadora Helaine Carrer, pela orientação e o apoio desde a minha chegada ao CEBTEC da ESALQ;

Ao Professor Dr. Quirino A.C. Carmello pelas orientações e todas as contribuições feitas ao longo desta tese;

Ao Dr. Daniel Alves Ramiro, o meu apreço pelo forte apoio nas fases iniciais, quando a nossa proposta tomou forma e na fase de acabamento;

A Fátima De Martin, pelo apoio dia a dia, ainda mais se era necessárias;

Ao Flavio dos Santos, seu apoio em fases cruciais na casa de vegetação, incansável e sempre pronto;

Ao Dr. Enio Tiago Oliveira pelo apoio para iniciar o ensaio preliminar;

Ao Dr. Fernando Angelo Piotto do Departamento de Genética e o engenheiro Marcelo Corrêa Alves do CIAGRI, pelo grande apoio nos programas R 2,15,aa0 e SAS 9,2;

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular do CEBTEC, Marta, Geraldo, Paulo, André, Andrés, Estevam, Tabata, Juan, Giovanni, Evandro, entre outros;

A Secretaria Solizete Granziol do PPG em Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela sua cooperação antes de nossa chegada ao Brasil;

Para todos os que participaram deste caminho, tão marcante na minha vida. Muito obrigado...!

"E, se bem que seja obscuro
Tudo pela estrada fora,
E falso, ele vem seguro,
E, vencendo estrada e muro,
Chega onde em sono ela mora.
E, inda tonto do que houvera,
A cabeça, em maresia,
Ergue a mão, e encontra hera,
E vê que ele mesmo era A Princesa que dormia.".

Fernando Pessoa

# SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	14
1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A cultura da "cana-de-açúcar"	21
2.2 A produção de cana-de-açúcar no Brasil e no mundo	22
2.3 Genética e ecofisiologia da produtividade na "cana-de-açúcar"	23
2.4 Obtenção dos nutrientes minerais do solo: regulação, absorção e transpo	orte a
curta e longa distância	25
2.5 O Nitrogênio e seu metabolismo no caso do NO <sub>3</sub>	27
2.6 A nutrição nitrogenada comparando as fontes amoniacais e de nitrato	29
2.7 Estudos das famílias de genes dos transportadores de NO3 com ênfa	se na
célula vegetal	31
2.8 Enzima nitrato redutase assimilativa aspectos fundamentais	34
2.8.1 Mecanismos Moleculares de Regulação da NIA	35
2.8.2 O controle da atividade NIA	37
2.9 Fotossíntese C <sub>4</sub> , nutrição nitrogenada e uso eficiente da água	38
2.10 Fisiologias da partição de fotoassimilados e a redução de nitratos	43
3 MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 Material vegetal	44
3.2 Ensaio preliminar	45
3.2.1 Escolha do material vegetal	46
3.3 Procedimentos para estabelecer os experimentos	47
3.4 Distribuição dos tratamentos	50
3.5 Sistema hidropônico	50
3.6 Preparação da solução nutritiva	51
3.7 Coleta dos experimentos e análise dos resultados	52
3.8 Atividade da enzima nitrato redutase em folhas e raízes	53
3.9 Experimento 1	53
3.10 Experimento 2	55
3.11 Experimento 3	56

3.11.1 Determinações da massa fresca e seca da parte aérea e raízes e índice	de
massa da parte aérea e raízes	.57
3.11.2 Determinação do conteúdo de clorofilas "a", "b", total e da razão "a/b"	.58
3.12 Análises bioinformática para estudos de expressão em genes candidatos	.59
3.13 Extração de RNA total por "pull" de replicas usando TRIzol	.59
3.14 Tratamento estatístico dos resultados	.59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	.62
4.1 Experimento 1	64
4.2Experimento 2	72
4.3 Experimento 3	76
5 CONCLUSÕES1	03
6 RECOMENDAÇÕES1	05
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS1	07
8 REFERÊNCIAS 1	09

#### **RESUMO**

# Avaliação fisiológica e bioquímica de cana de açúcar variedades RB 83-5089 e SP80-3280 em fase inicial de crescimento submetidas a doses de nitrato

A cana-de-açúcar do ponto de vista socioeconômico e do agronegócio é atualmente uma das culturas mais importantes e em ascensão em regiões dos trópicos e subtrópicos do mundo pela sua produção de biomassa e seu potencial como biocombustível. Para expandir o seu cultivo é necessário uma série de estudos, sobretudo no que se refere ao levantamento de características ecofisiológicas e agroclimáticas envolvidas na produção. A carência de estudos, juntamente com a baixa diversidade genética dos genótipos utilizados nos programas de melhoramento, limita a oferta de variedades adaptadas com alto potencial de rendimento. Desde a revolução verde, é reconhecido o papel da nutrição mineral no aumento da produtividade das culturas. Notadamente, a carência de nitrogênio é um dos principais fatores limitantes da produtividade canavieira. Assim, os objetivos gerais desta tese visam contribuir para a compreensão dos mecanismos de regulação da nutrição nitrogenada (eficiência no uso do nitrogênio), a partir dos processos envolvidos no transporte e redução do nitrato e seus efeitos no balanço carbono - nitrogênio, nas fases iniciais de desenvolvimento da cana-deaçúcar. Para isto foi feito um estudo nutricional nas variedades RB83-5089 e SP80-3280 por até 60 dias, num sistema hidropônico. Foi utilizada a solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada como base nutricional na qual foram adicionadas doses baixas (0.05; 0.1; 0.25; 0.5 mM) e altas (1.0; 2.5; 5.0; 10.0; 15.0 e 25.0 mM) de nitrato para medir os efeitos bioquímicos e fisiológicos na atividade da nitrato redutase em folhas e raízes. Foram utilizados como parâmetros o índice de massa e massa seca da parte aérea e raízes, o conteúdo e a razão clorofila "a" e "b", a taxa de assimilação fotossintética, a condutância estomática e a transpiração. Os resultados mostraram que a variedade SP80-3280 foi mais responsiva às aplicações de baixas e altas doses de nitrato e, de forma geral, a atividade da nitrato redutase não apresentou limitação na mobilização de nitrato via xilema e se confirmou que a cinética do processo foi dependente da dose fornecida para as duas variedades. Nas análises dos teores de clorofila "a", as duas variedades foram responsivas ao aumento das doses de N, entretanto, os teores de clorofila "b" foram direta e inversamente proporcionais às doses de N nas variedades SP80-3280 e RB83-5089, respectivamente. A análise de índice de massa junto com a massa seca permitiu estabelecer que não houveram diferenças significativas entre estas variedades no acúmulo de matéria seca.

Palavras-chave: Fotossíntese; Nitrogênio; NO<sub>3</sub>; Nitrato redutase

#### **ABSTRACT**

# Physiology and biochemistry evaluation of sugarcane varieties RB 83-5089 and SP 83-5089 in the initial stage of growth submitted to doses of nitrate

The sugarcane from the standpoint of socioeconomic and agribusiness is currently one of the most important crops in the tropics and subtropics areas of the world and it is in rising growth for its production of biomass and potential as biofuel. In order to expand the cultivation it is necessary a series of studies, especially with regard to agroclimatical ecophysiological characteristics involved in the production. The lack of studies, along with low genetic diversity of the genotypes used in breeding programs, limits the supply of adapted varieties with high yield potential. Since the green revolution, it is recognized the importance of nutrition to increase crop productivity. Notably, the deficiency of nitrogen is one of the main limiting factors affecting sugarcane yield. Thus, the overall objectives of this thesis aim to contribute to understand the regulatory mechanisms of nitrogen nutrition (nitrogen use efficiency), by the processes involved in the transport, nitrate reduction and its effects on the carbon - nitrogen balance, in early stages of development of sugarcane. To this, a nutritional study was prepared using sugarcane varieties RB83-5089 and SP80-3280 for 60 days in a hydroponic system. It was used Hoagland and Arnon (1950) modified solution as the nutritional basis on which was added low (0.05, 0.1, 0.25; 0.5 mM) and high (1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 and 25.0 mM) doses of nitrate to measure the biochemical and physiological effects on the activity of nitrate reductase in leaves and roots. The parameters analysed were, the index of mass and dry weight of shoots and roots, chlorophyll "a" and "b" content and its ratio, photosynthetic assimilation rate, stomatal conductance and transpiration. The results showed that the variety SP80-3280 was more responsive to low and high levels of nitrate and, in general, the activity of nitrate reductase showed no limitation in the mobility of nitrate via xylem and it confirmed that the kinetics of the process was dependent on the doses provided to the two varieties. In the analysis of chlorophyll "a" content, the two varieties were responsive to the increase of N doses. However, the level of chlorophyll "b" was directly and inversely proportional to N rates in SP80-3280 and RB83-5089, respectively. The analysis of mass index with dry weight allowed establishing that there were no significant differences between these varieties regarding to dry tissue accumulation.

Keywords: Photosynthesis: Nitrogen; NO<sub>3</sub>; Nitrate reductase

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Sistema vaso - garrafa para armazenar e repor a solução nutritiva para os

vas	sos no sistema hidropônico utilizado51
ava col tra	squema representativo dos componentes do experimento 1, no qual a aliação nutricional das duas variedades foi feita com tratamentos cujas ncentrações de nitrato estão ligadas ao funcionamento dos sistemas de ansporte de nitrato, tratamentos nomeados de baixa (faixa de 0,0 até 75 mM) e alta (faixa de 1,0 ate 15,0 mM) concentrações de NO <sub>3</sub> 54
	eta de regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em folha, RB83-5089 submetida a doses altas65
	eta de regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em folha, RB83-5089 submetida a doses altas66
	eta de regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz, RB83-5089 submetida a doses baixas66
-	álise de regressão da atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz, SP80-3280, submetida a doses altas67
•	nálise de regressão da atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz s SP80-3280 em resposta a doses baixas de nitrato74
_	nálise de regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em iz na SP80-3280 em resposta a doses baixas de nitrato74
va	Comparação visual dos padrões da altura e morfologia das duas riedades submetidas a uma dose de 2,5 mM de nitrato, na solução tritiva
RE	valiações mediante leituras repetidas para a fotossíntese nas variedades 383-5089 (RB) e SP80-3280 (SP) submetida a doses baixas num ríodo de 35 dias85
va	Avaliações mediante leituras repetidas para a fotossíntese nas riedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP) submetida a doses altas im período de 35 dias
na	Avaliações mediante leituras repetidas para a condutância estomática is variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP) submetida a doses iixas num período de 35 dias
na	Avaliações mediante leituras repetidas para a condutância estomática is variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP), submetida a doses as num período de 35 dias

Figura	14	- Avaliações mediante leituras repetidas para a taxa de transpiração no variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP) submetida a doses baix num período de 35 dias	as
Figura	15	o - Avaliações mediante leituras repetidas da taxa de transpiração na variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP), submetidas a doses alta num período de 35 dias	as
Figura	16	- Coleta das plantas da variedade SP80-3280, submetidas as doses alta de nitrato no final do experimento 3	
Figura	17	- Coleta das plantas da variedade da variedade RB83-5089, submetidas doses altas de nitrato, a foto apresenta os vasos que recibiram a doses 10.0: 15.0 e 25 mM, no experimento 3	

# LISTA DE TABELAS

as concentrações utilizadas no ensaio preliminar com as variedades RB93-5744, RB72-454, e SP80-3280
Tabela 2 - Soluções de Hoagland e Arnon (1950) modificadas, correspondentes com as concentrações para o funcionamento dos sistemas de transporte de nitrato de alta afinidade (HATS), os quais respondem às doses menores ou iguais de 0,75 mM
Tabela 3 - Soluções de Hoagland e Arnon (1950) modificadas, correspondentes com as concentrações para o funcionamento dos sistemas de transporte de nitrato de baixa afinidade (LATS), os quais respondem às doses maiores ou iguais a 1,0 mM
Tabela 4 - Cronograma das leituras das variáveis indicadoras de fotossíntese para o período de 42 dias compreendidos entre 08 de março e 11 de abril de 2012
Tabela 5 – Cálculos utilizados para determinar a quantidade de clorofila "a", clorofila "b" e clorofila total de cada amostra das duas variedades
Tabela 6 - Resultados das médias das 4 plantas avaliadas na atividade da enzima nitrato redutase em folhas das 3 variedades submetidas as doses de nitrato no ensaio preliminar
Tabela 7 - Resultados das médias das 4 plantas avaliadas na atividade da enzima nitrato redutase em raiz das 3 variedades submetidas as doses de nitrato no ensaio preliminar
Tabela 8 - Comparação das médias para atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, quando as duas variedades foram submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato
Tabela 9 - Comparação das médias para atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, quando as duas variedades foram submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato
Tabela 10 - Comparação de médias da atividade NIA em raízes na variedade SP80 3280, pelo teste de Tukey para o nível de confiança de 95%67
Tabela 11 - Comparação das médias para a variável taxa de assimilação fotossintética (A) das leituras feitas aos 23 dias e 31 dias nas duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato69
Tabela 12 - Comparação das médias para a variável taxa de assimilação fotossintética (A) das leituras feitas aos 23 dias e 31 dias nas duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato69

Tabela 13 - Comparação das médias para a variável condutância estomática (Gs das leituras feitas aos 23 dias e 31 dias nas duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato
Tabela 14 - Comparação das médias para a variável condutância estomática (Gs das leituras feitas aos 23 dias e 31 dias nas duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato
Tabela 15 - Comparação das médias para a variável taxa de transpiração (E) das leituras feitas aos 23 dias e 31 dias nas duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato
Tabela 16 - Comparação das médias para a variável taxa de transpiração (E) das leituras feitas aos 23 dias e 31 dias nas duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato
Tabela 17 - Teste de Tukey para comparação das médias de atividade da nitrator redutase em folhas e raízes (NIA_F e NIA_R) para os tratamentos con doses baixas, para o nível de confiança de 95%
Tabela 18 - Teste de Tukey para comparação de médias da atividade nitrator redutase assimilativa para as doses altas, variedade SP80-328073
Tabela 19 - Comparação das médias de atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, a partir dos resultados das variedades quando foran submetidas as doses baixas de nitrato
Tabela 20 - Comparação das médias da atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, a partir dos resultados das variedades quando foran submetidas as doses altas de nitrato
Tabela 21 - Comparação das médias para índice de massa, a partir dos resultados das variedades quando foram submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato
Tabela 22 - Comparação das médias para índice de massa da parte aérea, a parti dos resultados das variedades quando foram submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato
Tabela 23 - Comparação das médias da massa seca a partir dos resultados das variedades quando foram submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato
Tabela 24 - Comparação das médias da massa seca a partir dos resultados das variedades quando foram submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato
Tabela 25 - Diferenças entre as médias dos indicadores de fotossíntese da RB83 5089, submetida a baixas doses de nitrato, através do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer

Tabela 26 - Diferenças entre as médias dos indicadores de fotossíntese da SP80 3280, submetida a baixas doses de nitrato, através do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer82
Tabela 27 - Diferenças entre as médias para indicadores de fotossíntese da SP80 3280, submetida a doses altas, através do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer
Tabela 28 - Comparação das médias da variável conteúdo de clorofila "a" em g/L das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato
Tabela 29 - Comparação das médias da variável conteúdo de clorofila "a" em g/L das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas doses de nitrato
Tabela 30 - Comparação das médias da variável conteúdo de clorofila "b" em g/L das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato
Tabela 31 - Comparação das médias da variável conteúdo de clorofila "b" em g/l para as duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato
Tabela 32 - Comparação das médias da razão das clorofilas "a/b" das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato94
Tabela 33 - Comparação das médias da razão das clorofilas "a/b" das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato94
Tabela 34 - Análise de regressão linear simples com o nitrato como fator e 18 variáveis de resposta, avaliando as duas faixas de doses nas variedades RB83-5089 e SP80-3280, experimento 3
Tabela 35 - Análise de regressão linear simples com as 4 variáveis de clorofila como fator frente a 16 variáveis de resposta, avaliadas na faixa das doses altas nas variedades RB83-5089 e SP80-3280, no experimento 397

# 1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), devido à sua relevância na agroindústria pela produção e comercialização de açúcar e etanol, é um dos principais produtos cultivados no Brasil e também em países da América Central e do Caribe (COELHO, et al., 2003). Do ponto de vista socioeconômico, o cultivo e as atividades relacionadas à comercialização dos derivados da cana-de-açúcar têm um papel crescente no desenvolvimento dos países produtores, sendo responsável pela criação de milhões de empregos diretos e indiretos (MURILLO et al., 2006). Em adição, a busca por fontes de energia alternativas ao petróleo impulsiona o aumento do seu cultivo ao redor do mundo (GOLDEMBERG, 2008).

Para satisfazer a demanda crescente por produtos derivados da cana-de-açúcar é fundamental a liberação frequente de variedades melhoradas, que atendam ao aumento do consumo, o que até agora tem sido alcançado com relativa eficiência por melhoramento tradicional (HOTTA et al., 2010). Entretanto, existem limitações para a expansão do cultivo a partir de novas variedades devido, por um lado, a escassez de estudos ecofisiológicos e edafoclimáticos direcionados ao desenvolvimento de cultivares que apresentem alta eficiência no uso de nutrientes, como nitrogênio (N) e fósforo (P), e por outro lado, à limitada variabilidade genética da cana-de-açúcar decorrente da baixa diversidade genética utilizada nos programas de melhoramento (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011).

As plantas cultivadas têm acesso a uma diversidade de fontes de nitrogênio (orgânico e inorgânico) que inclui as formas amoniacais (NH<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), as nítricas (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), os aminoácidos, peptídeos solúveis e insolúveis e compostos complexos contendo nitrogênio (WILLIAMS; MILLER, 2001). No entanto, a disponibilidade de nitrogênio no solo tem sido identificada como uma limitação importante para a produtividade das culturas, em muitas regiões dos trópicos (WEERARATNA, 1989), devido, principalmente, à dinâmica particular deste nutriente e sua ampla demanda na natureza (MILLER; CRAMER, 2004).

Em termos práticos, os compostos do nitrogênio se dividem em dois grupos: os não-reativos e os reativos (GALLOWAY et al., 2003). O nitrogênio não-reativo é encontrado, obrigatoriamente, em sua forma molecular biatômica (N<sub>2</sub>) no estado gasoso. O nitrogênio reativo (Nr) inclui todos aqueles compostos ativos biológicos, fotoquimicamente reativos e os compostos de nitrogênio radioativos na atmosfera e

na biosfera da Terra. Este grupo inclui as formas inorgânicas reduzidas de nitrogênio (NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), formas oxidadas inorgânicas (NOx, HNO<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e compostos orgânicos (uréia, aminas, proteínas, nucleotídeos etc.) (GALLOWAY et al., 2004). Atualmente, estima-se que aproximadamente 40% da população mundial, é sustentada por Nr criado com o processo Haber-Bosch (GALLOWAY, 2005). A interconversão entre as diferentes espécies de nitrogênio define o caráter cíclico apresentado por este elemento na natureza (RICHARDSON; WATMOUGH, 1999).

Um destes processos, a redução do nitrato (NO<sub>3</sub>) a nitrito (NO<sub>2</sub>), é de primordial importância no ciclo do nitrogênio e tem graves implicações para a agricultura, o ambiente e a saúde pública (GALLOWAY, 2005). O uso excessivo de fertilizantes nitrogenados é um dos responsáveis pela contaminação de águas subterrâneas e dos mananciais e, consequentemente, pela elevação dos teores de nitrato na alimentação humana (XU et al., 2012).

A aquisição e a distribuição de compostos nitrogenados são essenciais para os processos de crescimento e desenvolvimento de plantas, dado o importante papel deste elemento em biomoléculas, tais como, proteínas e ácidos nucléicos. A incorporação de nitrogênio em alimentos é um processo que apresenta baixa eficiência. Do total de Nr utilizado para a produção de alimentos, menos de 20% é ingerido pelo homem. O restante é perdido para o ambiente através da atmosfera, hidrosfera, ou é armazenado no solo (GALLOWAY, 2005).

O aumento na eficiência do uso do nitrogênio (EUN) é fundamental para a redução dos custos da produção agrícola e dos efeitos prejudiciais causados ao homem e ao meio ambiente (XU et al., 2012). Para tal, é necessário um amplo entendimento das vias metabólicas, enzimas, transportadores e mecanismos reguladores que regem a incorporação do N nas plantas.

A assimilação de N é um processo de múltiplas etapas que envolvem uma série de reações enzimáticas, localizadas em diferentes compartimentos celulares e em diferentes órgãos das plantas (GALLARDO; CANOVAS, 2002). As vias metabólicas do N seguem uma rede de regulação complexa, que é sinalizada pelos teores relativos de N orgânico comparado com os teores de N inorgânico disponíveis (KROUK et al., 2010; XU et al., 2012). A complexidade da regulação se reflete na expressão de um emaranhado de genes que controlam diretamente e/ou indiretamente o processo de absorção e assimilação de nitrogênio (ENGELS; MARSCHNER'S, 1995). Além disso, o fornecimento de N para as raízes das plantas

está sujeito à variação considerável dentro do período de crescimento, dependendo da taxa de mineralização ou fertilização. Assim, não é surpreendente, as plantas terem desenvolvido mecanismos e estratégias não só para a aquisição e o uso eficiente do N, mas também para a economia e uso interno (ENGELS; MARSCHNER'S, 1995; KOPRIVA; KOPRIVOVA, 2005).

Desta maneira o uso eficiente do nitrogênio das plantas com fotossíntese C<sub>4</sub> precisa estar relacionado ao desempenho metabólico dos transportadores de nitrato e da nitrato redutase assimilativa, além de estar sob os efeitos regulatórios das sinalizações decorrentes do status de N inorgânico vs N orgânico (HOTTA et al., 2010).

Neste contexto, os objetivos gerais desta tese visam contribuir para a compreensão dos mecanismos de regulação da nutrição nitrogenada (eficiência no uso do nitrogênio), a partir dos processos envolvidos nas atividades de transporte e redução do nitrato e seus efeitos no balanço carbono nitrogênio, nas fases iniciais de desenvolvimento da cana-de-açúcar.

Mais precisamente, este trabalho teve como objetivos específicos:

- Vincular as doses dos tratamentos com os padrões de atividade celular da nitrato redutase assimilativa e a sua influência no balanço da relação C/N;
- Identificar indicadores para avaliar a eficiência do uso do nitrogênio (EUN) em cana-de-açúcar sob os efeitos de doses de nitrato;
- Avaliar os efeitos das doses de nitrato no conteúdo de clorofila, na massa seca de parte aérea e raízes ao final da fase de desenvolvimento avaliada na cana-deaçúcar;
- Avaliar os níveis de fixação de CO<sub>2</sub> sob a indução por doses de nitrato nas fases iniciais de desenvolvimento, em diferentes variedades de cana-de-açúcar;
- Avaliar a eficácia das descrições fisiológicas das variedades, através de medidas dos indicadores de fotossíntese, em relação às demais variáveis avaliadas.

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 A cultura da "cana-de-açúcar"

A localização exata do centro de origem da cana se mantém no debate até hoje. O critério geral para o centro de origem é baseado na concentração geográfica de muitas espécies representantes do complexo "Saccharum", a área compreende a partes da Índia, China, Nova Guiné e zonas vizinhas (SUBIRÓS-RUIZ, 1995; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, et al., 2011). Os registros mostram que a chamada cana nobre (Saccharum officinarum) foi importante na dieta de civilizações antigas em torno dos 3000 aC., quando foi usada para ser mastigada e para a utilização de seu suco como bebida (SUBIRÓS-RUIZ, 1995).

Hoje, com grandes áreas de produção em regiões tropicais e subtropicais do mundo, a cultura da cana-de-açúcar está distribuída em latitudes entre 35°N e 35°S (VAN DILEWIJN, 1952; CHEAVEGATTI-GIANOTTO, et al., 2011). Estima-se que é plantada em 90 países, abrangendo cerca de vinte milhões de hectares, com açúcar e o álcool como seus principais produtos industriais, sendo o Brasil o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (BALDANI, et al., 2002). Nos últimos 25 a 30 anos a cultura canavieira tem gerado grandes expectativas pelas potenciais possibilidades para a produção de energia sustentável (ARRUDA, 2011).

Os cultivares modernos da cana-de-açúcar são produtos de cruzamentos entre espécies do gênero Saccharum, realizados por produtores no final do século XIX (MATSUOKA et al., 2009). As espécies mais importantes, pela sua contribuição na criação das variedades modernas de cana foram *S. officinarum*, que tem sido muito apreciada desde a antiguidade pela sua capacidade para acumular sacarose no colmo, e *S. spontaneum*, um parente selvagem vigoroso e bem adaptado, que forneceu, principalmente, os genes de resistência a doenças e estresse (D'HONT et al., 1996).

A cana-de-açúcar, dentre as culturas comerciais conhecidas, é uma das mais complexas geneticamente. Esta complexidade genética das variedades modernas de cana-de-açúcar, decorrente do elevado nível de ploidia e da ocorrência de aneuploidia, constituem um dos principais obstáculos para a geração de variedades melhoradas (HOTTA, et al., 2010). Os clones provenientes dos cruzamentos entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, representam o maior grupo dos clones parentais

atualmente disponíveis. Consequentemente, a base genética útil para o desenvolvimento de novas variedades é estreita, expondo a cultura a um risco fitossanitário potencial, que pode comprometer as atividades do setor sucroalcooleiro (NAIR et al., 1999).

No curto prazo, o tamanho e a complexidade do genoma da cana-deaçúcar são os principais fatores limitantes no melhoramento e desenvolvimento de novas variedades (VICENTINI et al., 2012). Essas características da cultura, além do escasso conhecimento da sua ecofisiologia, e das carências técnicas na lavoura e plantio, têm contribuído para a baixa produtividade dos canaviais, principalmente entre os pequenos produtores, no mundo todo.

### 2.2 A produção de cana-de-açúcar no Brasil e no mundo

A cultura de cana-de-açúcar exerce um papel de grande importância na economia de diversos países dos 5 continentes do mundo, tendo maior destaque nas economias da América Latina e Caribe (BALDANI, et al., 2002). A história da cana-de-açúcar no Brasil confunde-se com a história do próprio país, uma vez que seu ciclo iniciou-se logo após a chegada dos portugueses, passando por oscilações desde o período colonial até os dias de hoje. No século XX, até o início da década de 70, o setor açucareiro passou por várias crises (Cana-de-açúcar, 1997). No entanto, em meados daquela década, o país implantou o maior programa de combustível biológico do mundo, o PROÁLCOOL, que além de atenuar a dependência brasileira pelo petróleo (na época, o país importava cerca de 84% de sua necessidade diária de petróleo), permitiria reduzir significativamente a emissão de monóxido de carbono em 57 %, a de hidrocarbonetos em 64 % e a de óxidos de nitrogênio em cerca de 13 % quando comparados com carros à gasolina da época. Com o PROÁLCOOL, o país diminuiu a importação de petróleo no equivalente a 200.000 barris por dia, e em termos socioeconômicos representou a criação de cerca de um milhão de empregos e ao redor de 1,0 bilhão de US Dólares por ano na economia de divisas (BALDANI, et al., 2002).

Ao nível mundial, o rendimento e a produtividade da cultura canavieira seguiram tendências crescentes nas últimas décadas. Importantes produtores mundiais, como o Brasil, alcançaram índices de produtividade de até 80 ton há<sup>-1</sup> em

2009, o que corresponde a um aumento de aproximadamente 25% na produtividade, quando comparado à safra brasileira de 1980 (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009). Em adição, quando incorporado à produtividade, os índices de aproveitamento energético durante toda a cadeia de produção do etanol, o Brasil se destaca como o principal país produtor de cana-de-açúcar (BALDANI et al., 2002). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com cerca de 7,5 milhões de hectares cultivados, produzindo cerca de 612 milhões de toneladas na safra 2009/2010 (CONAB, 2012). Destes, cerca da metade da cana-de-açúcar produzida foi utilizada para a produção de açúcar, o restante foi usado para produzir 25 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2012). Em 2009, as exportações brasileiras de açúcar e etanol geraram aproximadamente 9,9 bilhões de dólares americanos, tornando a cana-de-açúcar em terceiro lugar entre as suas exportações (CONAB, 2012).

O Brasil, para a safra 2012/2013 tem uma estimativa de produção total de cana-de-açúcar de 5 96.629,8 (em 1.000 toneladas), das quais 300.817,3 (em 1.000 toneladas) serão destinadas para açúcar, e 295.812,5 (em 1000 t) para o etanol, a partir de uma área de 8.527,770 (em milhes de ha), com produtividade estimada de 69.963 (em kg/ha) (CONAB, 2012).

### 2.3 Genética e ecofisiologia da produtividade na "cana-de-açúcar"

As expectativas que tem sido gerada pela cultura da cana-de-açúcar a partir das potenciais possibilidades para a produção de energia sustentável (ARRUDA, 2011), também tem propiciado o requerimento de melhoras técnicas para uso no campo. O Brasil como maior produtor e o único no mundo em utilizar o etanol em larga escala como combustível renovável e alternativo ao petróleo (BALDANI, et al., 2002; GOLDEMBERG, 2008; ARRUDA, 2011), precisa contar com uma estratégia para atender à demanda projetada para o crescimento do setor, pelo qual consequentemente, a área agrícola deverá se ampliar em produção e produtividade, esta ultima decorrente do fornecimento de variedades melhoradas (HOTTA, et al., 2010).

Sendo assim, os programas de melhoramento genético da cana-de-açúcar precisam priorizar os processos de hibridação e seleção na tentativa de obter

cultivares mais produtivas e adaptadas (MANNERS; CASU, 2011). Pela via tradicional de melhoramento genético, existe a limitação do tempo necessário para que uma nova variedade consiga alcançar a comercialização (12-15 anos) (HOTTA, et al., 2010). Por outro lado, as variedades comerciais de cana-de-açúcar foram obtidas de uma estreita base genética, a partir da seleção massal de progênies provenientes do intercruzamento entre espécies cultivadas e selvagens de *Saccharum* (D'HONT; GLASZMANN 2001; D'HONT 2005). Para não expor a cultura a um risco de pragas e doenças que comprometa as atividades de todo o setor canavieiro (SANTOS, 2008; ROSSATO, et al., 2010), é necessário intercruzar com gêneros relacionados, tais como *Erianthus*, *Miscanthus*, *Narenga* e *Sclerostachya* (CHEAVEGATTI-GIANOTTO, et al., 2011).

Logo e num sentido pratico das aplicações ecofisiológicas é necessário acometer, por exemplo, a seleção para variedades de cana-de-açúcar com maior capacidade fotossintética, na ideia de obter maior acumulação de açúcar não limitada pela temperatura, déficit hídrico, ou disponibilidade de nutrientes (INMAN-BAMBER et. al. 2002). Pode ser difícil aumentar os níveis de sacarose no colmo sem primeiro conhecer consistentemente os fatores que afetam a produtividade da cana e o particionamento do carbono fixado na fotossíntese.

Então para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar, um aspecto fundamental é a regulação do seu aparato fotossintético (HOTTA et al., 2010). Em principio o metabolismo C<sub>4</sub> da cana-de-açúcar faz a concentração do CO<sub>2</sub> nos tecidos fotossinteticamente ativos, por algum dos três mecanismos conhecidos nas plantas C<sub>4</sub>. Deles há evidências de que a cana-de-açúcar tem possivelmente dois mecanismos, um pela enzima NADP-ME, e outro pela enzima PCK (CALSA; FIGUEIRA, 2007), o que sugere que este dois tipos de metabolismo C<sub>4</sub> podem complementar-se (CHRISTIN et al., 2007). As implicações fisiológicas da presença de ambas as vias e como elas poderiam ser exploradas para aumentar a produtividade da cana-de-açúcar ainda é desconhecida (HOTTA et al., 2010).

Por outro lado, experimentos feitos em cana-de-açúcar mostraram que o estresse hídrico reduziu a fotossíntese da planta inteira em 18% e taxa de extensão da planta toda em 41%, resultando em uma redução de 19% da biomassa total. No entanto, o mesmo estresse hídrico aumentou o ganho da massa de sacarose 27% e o teor de sacarose da massa seca aumentou em 37%, confirmando que o déficit hídrico reduziu a demanda por fotoassimilados para a produção de fibra e altura da

planta, de modo que o excesso de fotoassimilados foi acumulado sob a forma de sacarose (INMAN-BAMBER et al. 2008).

O interesse por alcançar a exploração do máximo potencial produtivo da cana-de-açúcar, depende da otimização de técnicas agronômicas nos aspectos da nutrição-fertilização focada nos requerimentos próprios das novas variedades de cana-açúcar que sejam incorporadas na produção neste novo cenário.

# 2.4 Obtenção dos nutrientes minerais do solo: regulação, absorção e transporte a curta e longa distância

Em geral, nem a solução do solo, nem mesmo as soluções nutritivas formuladas pelos pesquisadores possuem as concentrações dos elementos minerais nas quantidades exatas necessárias para o crescimento e desenvolvimento ótimo das plantas. As condições experimentais ligadas aos estudos nutricionais com frequência ficam longe do que acontece na natureza, nesse sentido vários autores têm se referido dizendo que as concentrações de nitrogênio inorgânico nas soluções do solo variam em diversas ordens de magnitude, entre os diferentes solos e como resultado de variações sazonais (KRAISE et al., 2011). Para responder a essa heterogeneidade, as plantas desenvolveram mecanismos para regular a absorção de NO<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub> (GLASS et al., 2002), permitindo a sua partição para o crescimento e desenvolvimento da planta sob uma variedade de condições ambientais (WILLIAMS; MILLER, 2001; HIREL et al., 2011). Desta forma, as plantas evoluíram e desenvolveram mecanismos que permitem a absorção e a acumulação seletiva de nutrientes. No entanto, estas características são dependentes do genótipo, mas independentes das concentrações dos elementos nutritivos na solução fonte (MARSCHNER'S, 1995).

O influxo no apoplasto, ou seja, o movimento de solutos de baixo peso molecular (por ex., íons, ácidos orgânicos, aminoácidos, açúcares) da solução externa do solo para a planta, é um processo passivo realizado através de um sistema interconectado de paredes celulares e espaços intercelulares da raiz (no espaço livre aparente). Neste, os poros da parede celular oscilam em até 5.0 nm de diâmetro, e através dos quais o movimento dos íons por difusão ou fluxo de massa no espaço livre não parece sofrer qualquer resistência (MARSCHNER'S, 1995). Em

contrapartida, a entrada de solutos com altos pesos moleculares (por ex., quelatos metálicos, ácidos fúlvicos, toxinas, vírus e outros patógenos) são severamente restringidos ou impedidos.

Na mobilização via apoplasto do conteúdo em cátions o córtex da raiz (da exoderme às estrias de Caspary da endoderme) pode ser considerado como um reservatório temporário. O principal local de seleção e absorção de cátions, ânions e de solutos em geral é a membrana plasmática da célula (MARSCHNER'S, 1995). Após a membrana plasmática, outra barreira para a difusão de nutrientes é a membrana do vacúolo, ou tonoplasto (quando a célula amadurece o vacúolo representa entre 80 e 90% do volume celular, constituindo o compartimento central de armazenamento).

A membrana plasmática como local principal de seletividade e transporte de solutos contra um gradiente de concentração requer energia, a qual é suprida por transportadores ou permeases, presentes nas membranas. Esta energia (por ex. ATP) é utilizada para ativar o transportador e favorecer sua ligação aos íons, atravessar o complexo íon-transportador pela membrana e liberar o íon na superfície interna da membrana plasmática (MARSCHNER'S, 1995).

Existem duas vias de movimento de água e solutos: uma, passando através do apoplasto (entre o espaço intercelular e a parede celular) e outra, passando de célula a célula pelo simplasto, através de canais chamados de plasmodesmas, os quais atravessam as paredes das células e conectam os citoplasmas de células vizinhas.

Para os nutrientes minerais, a via simplástica desempenha um papel fundamental, tendo início na rizoderme e nos pêlos radiculares, passando por exoderme e endoderme até liberar seu conteúdo no estelo, onde os íons e solutos orgânicos (aminoácidos e ácidos orgânicos) são liberados no xilema. Esta liberação é regulada de forma independente da absorção dos íons nas células do córtex. Esta separação oferece à planta a possibilidade de um controle seletivo da taxa de transporte em longa distância até a zona apical da planta (MARSCHNER'S, 1995).

O transporte em longa distancia da água e solutos (elementos minerais e compostos orgânicos de baixo peso molecular) tem lugar no sistema vascular das plantas, constituído pelo xilema e floema, ocorrendo, principalmente, no xilema.

## 2.5 O Nitrogênio e seu metabolismo no caso do NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais importantes para a vida no planeta, 98% do nitrogênio total na terra encontram-se na litosfera. Ele junto a elementos químicos como o carbono (C), fósforo (P), oxigénio (0), e enxofre (S), são todos necessários para a vida, mais com a única exceção do N, eles são geralmente disponíveis em reservatórios globais para sustentar as formas de vida, desde os organismos unicelulares até os vertebrados (PAUL; CLARK, 1989; GALLOWAY, et al., 2003). Desses elementos, nitrogênio tem a maior abundância total na atmosfera, hidrosfera e biosfera da terra, é irônico que o N é o elemento menos prontamente disponível para sustentar os organismos vivos. A quantidade total de N na atmosfera, solos e águas da terra é de aproximadamente 4 10<sup>21</sup> gramas (g) - mais do que a massa de todos esses quatro outros elementos combinados (MACKENZIE, 1998).

No entanto, no caso do solo, as formas predominantes são a orgânica (90%) e inorgânica (10%) (NELSON; COX, 2009). Na forma orgânica nitrogênio, ele é parte de macromoléculas e polímeros, principalmente como proteínas (30 – 40%), aminoaçúcares (5 – 10%), purinas e/ou pirimidinas (1 – 2%) e como parte de compostos não identificáveis (50%) (FASSBENDER, 1978). Na forma inorgânica geralmente encontrasse conformada pelo amônio, nitrato e N mineral (FASSBENDER, 1978).

O nitrato como fonte de N na fertilização, é um agroquímico de extrema importância, tanto pelo volume utilizado como por seu impacto ao nível econômico e ambiental. No ambiente, este íon está relacionado com três processos fundamentais de redução: a respiração com nitrato (onde o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é o receptor final dos elétrons em condição anaeróbica); a dissimilação (que é um processo de dissipação do poder redutor); e a assimilação redutiva (onde o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> atua como fonte de N para o crescimento celular, o qual ocorre em bactérias, fungos, algas e plantas superiores) (GUERRERO et al., 1981).

Na assimilativa redutiva após a entrada do íon no interior da célula o nitrato é reduzido a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase assimilativa (NIA). O nitrito produzido será, posteriormente, reduzido a amônio pela enzima nitrito redutase (NIR). Uma vez ocorrida à redução, se o amônio estiver disponível em grandes quantidades nas células, a assimilação se dará através da via da enzima Glutamato

Desidrogenase (GDH); caso contrário, se as concentrações celulares forem baixas, o amônio será preferencialmente assimilado pela via da Glutamato Síntase – Glutamina Sintetase (GS-GOGAT) (LEA, 1999).

A fórmula parcial da redução assimilativa de nitrato (redução do nitrato a nitrito) é:

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + 2e<sup>-</sup> + 2H<sup>+</sup> 
$$\Longrightarrow$$
 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O  
NO<sub>3</sub><sup>-</sup> + NADH  $\Longrightarrow$  NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NAD<sup>+</sup> + OH<sup>-</sup>  
 $\Delta G = -34,2 \text{ kcal/mol (-143 kJ/mol); } \Delta E D = 0,74V$ 

A fórmula parcial da reação de redução do nitrito em amônia catalisada pelo nitrito redutase (NIR) é:

$$NO_2^- + 6 e^- + 8 H^+ \implies NH_4^+ + 2 H_2O$$

A absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é regulada pela fonte de nitrogênio, pelos níveis de fixação de CO<sub>2</sub> e pela dose de radiação UV (VIÑEGLA, 2000; TAPIA et al., 1995; GUERRERO;LARA., 1987). Esta regulação é centrada no sistema de transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (RAJU et al., 1996) e nos níveis celulares do controle transcricional da nitrato e nitrito redutase (FRANCO et al., 1984). Alguns efeitos fisiológicos são observados devido à carência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, como por exemplo, o aumento do potencial osmótico, com o preenchimento dos vacúolos pela água, estimulando a turgidez do tecido (MCINTYRE, 1997).

O amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), gerado no interior dos cloroplastos como resultado da redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, é assimilado com um custo energético sob a forma de ATP e poder redutor. Em todos os organismos capazes de assimilar NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a assimilação é inibida pelo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (GUERRERO et al., 1981). O NH<sub>4</sub><sup>+</sup> inibe não só a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mas também reprime a síntese das enzimas nitrato e nitrito redutase (GUERRERO; LARA,1987). O amônio em níveis elevados e como fonte única de N provoca um fluxo de saída celular que conduz a um ciclo de desintoxicação de elevado gasto energético, o qual acarreta numa redução do crescimento de plantas de cevada, não dependente do metabolismo do N (BRITTO et al., 2001).

O pool interno de aminoácidos pode indicar o *status* de nitrogênio nas plantas, fornecendo um sinal que regula a absorção de nitrato. Tanto os influxos do nitrato e do amônio, como a transcrição do transportador, diminuem no tecido da raiz tratada com aplicações externas de aminoácidos (MILLER et al., 2007). Dentre os

diversos aminoácidos testados pelos seus efeitos no influxo de nitrato e na transcrição dos transportadores, a glutamina tem apresentado resultados notáveis (FAN et al., 2006).

Nos primeiros estudos sobre a incorporação do nitrogênio nas plantas acreditava-se que o NO<sub>3</sub> era introduzido na célula por difusão simples (MARSCHESNER, 1995). Entretanto, estudos subsequentes em Synechococcus, revelaram a existência de proteínas de membrana, denominadas "transportadores cassete dependentes de ATP" (ABC) que participam da entrada de NO<sub>3</sub>, além de outros nutrientes e solutos (RODRIGUEZ et al., 1992; HIGGINS, 1992). Os avanços propiciados pela Biologia Molecular permitiram a identificação de um grande número de transportadores envolvidos no transporte de NO<sub>3</sub> / NO<sub>2</sub> em diversos organismos (FERNANDEZ et al., 1998; CRAWFORD; GLASS, 1998). Uma diversidade de transportadores, variando em seu padrão de expressão, afinidade, especificidade e capacidade para os compostos nitrogenados, foram caracterizados. A identificação destes genes abre novas perspectivas para o estudo da contribuição individual de cada transportador para a nutrição de nitrogênio e os processos de sinalização (WILLIAMS; MILLER, 2001). Em organismos eucarióticos, os genes que codificam proteínas transportadoras foram classificados em duas famílias: Nrt1 e Nrt2 (FORDE, 2000).

#### 2.6 A nutrição nitrogenada comparando o amônio com o nitrato

Tem sido referenciado por diversos autores que as plantas podem usar como fonte de nitrogênio tanto o NO<sub>3</sub> como o NH<sub>4</sub> (CROWFORD, 1995; SALISBURY; ROSS, 1994; XU et al., 2012; ). No entanto, não existe uma definição completa da forma de nitrogénio (NO<sub>3</sub> ou NH<sub>4</sub> ) apropriado para a produtividade máxima das culturas. MENGEL e KIRKBY (1987) sinalam que os resultados dos estudos nutricionais, são muito relativos e dependem da espécie de plantas, em relação a qual fonte (NO<sub>3</sub> ou NH<sub>4</sub> ) é melhor para elas crescerem. GALLOWAY (2005) considerou que esta resposta é válida, especialmente quando as condições culturais são otimizadas para cada fonte de N, reconhecendo que, em muitas condições de campo, a pergunta é difícil de responder porque, em condições favoráveis para o

crescimento das plantas, o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é rapidamente convertido em NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pela ação dos microrganismos do solo.

A este respeito, MENGEL e KIRKBY (1987) acrescentaram que, em contraste com o NO<sub>3</sub>-, o NH<sub>4</sub>+, devido às suas propriedades catiônicas, é fortemente adsorvido por minerais de argila de carga negativa. Estes autores relatam que este tipo de solos ricos em argila, frequentemente contêm quantidades que podem ser em média entre 2000 e 3000 kg ha<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>+ fixado.

Em relação aos efeitos do N - NO<sub>3</sub>, e N - NH<sub>4</sub>, por si só ou em combinação, tem sido documentado que uma proporção ideal de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / NO<sub>3</sub><sup>-</sup> favorece o crescimento de plantas de trigo (Triticum aestivem L.) de acôrdo com SANDOVAL (1992), é possível obter um maior rendimento em grãos e matéria seca, quando o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> é utilizado em proporção inferior ou igual a 50% da quantidade de N, que quando a planta for fornecida exclusivamente com NO3. A este respeito, ASHER; EDWARDS, (1983), sinalam que uma propriedade importante da formula de HOAGLAND modificada é que ó nitrogênio é suprido tanto na forma de amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) quanto de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Afirmam que suprir nitrogênio em mistura balanceada de cátions e ânions tende a reduzir o rápido aumento no pH do meio. Outros efeitos comprovados experimentalmente no milho tem a ver com a diferença no acúmulo de aminoácidos vs ácidos orgânicos, quando as plantas num cultivo hidropônico, tinham recebido aplicações de carbono inorgânico na solução nutritiva (NaH<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>). Nas plantas nutridas com amônio houve incorporação de <sup>14</sup>C nos aminoácidos, enquanto que as plantas supridas com nitrato alocavam relativamente mais <sup>14</sup>C em ácidos orgânicos. A composição de aminoácidos foi também dependente do tipo de fonte nitrogenada fornecida, houve maior acumulação de asparagina nas plantas nutridas com amônio (CRAMER; LEWIS, 1993).

Enquanto a o nitrato, no Brasil, a cana-de-açúcar é cultivada com relativamente baixas adições de N, raramente superior a 60 kg N ha<sup>-1</sup> no plantio e 80 a 120 kg N ha<sup>-1</sup> para as culturas de soca. O uso de baixas adições de fertilizante nitrogenado é justificado a partir dos resultados de 135 experimentos de campo realizados em todas as mais importantes áreas de cultivo de cana-de-açúcar do Brasil, em que o aumento significativo do rendimento devido à aplicação de fertilizante nitrogenado foi observado apenas em 19% dos estudos (AZEVEDO et al., 1986). Tendo em conta a origem das variedades utilizadas, pode-se dizer que o processo de seleção foi realizado em diferentes locais na identificação de genótipos

superiores com respeito ao desempenho agronômico e da tolerância aos estresses bióticos e abióticos (CHEAVEGATTI-GIANOTTO, 2011), portanto, não foram selecionadas para requerem doses elevadas de nitrogênio de qualquer das duas fontes (NO<sub>3</sub> ou NH<sub>4</sub>). Resultados recentes obtidos em dezenove acessos de Arabidopsis thaliana, cultivados em condições de baixa (2,0 mM) e alta (10,0 mM) doses de nitrato, verificou-se que a eficiência na remobilização do nitrogênio (ERN) e a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) são altamente dependentes do genótipo, o qual coincide com resultados obtidos em milho submetido a níveis baixos e altos de nitrogênio, os quais permitiram observar variância genética para a EUN (GALLAIS; HIREL, 2004). Além disso, em Arabidopsis foi comprovado que na EUN, os passos metabólicos limitantes são diferentes em dependência da dose, nas altas a EUN é ligada à absorção do nitrato, enquanto que nas doses baixas, a EUN, é determinada pelas mudanças na remobilização do nitrogênio (ERN) (XU, et al., 2012). Resultados obtidos para a variação genética na expressão da EUN (interna) em cana-de-açúcar, quando as mesmas foram submetidas a baixas e altas doses de nitrogênio, sinalaram diferenças na magnitude da produção de biomassa quanto da EUN de até três vezes nos genótipos de baixa demanda de nitrogênio ainda colocados em doses baixas, quando comparados com eles mesmos em doses altas. Também foi estabelecida uma correlação negativa entre aqueles dois caracteres e o conteúdo de proteína solúvel (ROBINSON, et al., 2007).

# 2.7 Estudos das famílias de genes dos transportadores de NO<sub>3</sub> com ênfase na célula vegetal

Devido à presença de plastídios, as células eucarióticas fotossintéticas são as células que apresentam os mais elevados níveis de compartimentalização. O alto nível de compartimentalização exige o transporte de solutos através de sistemas de membranas intracelulares, por meio de transportadores de membrana específicos. Os plastídios, como usina metabólica das células vegetais, estão envolvidos nas principais vias metabólicas das plantas, tais como a fixação fotossintética de dióxido de carbono, a assimilação de nitrogênio e enxofre, a síntese de ácidos graxos e aminoácidos, e a biossíntese terpenóides (LINKA; WEBER, 2010).

De todos os elementos minerais exigidos pelas plantas, o nitrogênio é necessário em maior quantidade e, frequentemente, é o principal fator limitante para o crescimento. No solo, o nitrogênio está disponível para as plantas sob diversas formas, incluindo amônia (NH<sub>3</sub> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrato, aminoácidos, peptídeos solúveis e insolúveis e compostos complexos contendo nitrogênio. A absorção de nitrogênio e sua partição na planta são realizadas por um conjunto de transportadores, diferencialmente regulados, que permitem o crescimento e desenvolvimento da planta sob uma variedade de condições ambientais (WILLIAMS; MILLER, 2001). As concentrações de nitrogênio inorgânico nas soluções do solo variam em diversas ordens de magnitude, entre os diferentes solos e como resultado de variações sazonais. Para responder a essa heterogeneidade, as plantas desenvolveram mecanismos para regular a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (GLASS et al., 2002).

Resultados obtidos em diversos projetos de sequenciamento genômico revelaram a presença de dezenas de famílias de transportadores. Duas famílias estão presentes em todos os organismos estudados até o momento: as superfamílias 'ATP-binding cassette' (ABC) e a 'major facilitator superfamily' (MFS) (PAULSEN; SLIWINSKI; SAIER JR., 1998). Os membros da superfamíla MFS, também chamados de "uniportador-cotransportador-antiportador", coordenam o transporte de solutos em resposta quimiosmótica a diferenças nos gradientes iônicos celulares. Nesta superfamília estão incluídas as famílias dos transportadores NNP (do inglês, Nitrate/Nitrite Porter) e PRT dos transportadores de peptídeos, ambos presentes em bactérias, leveduras e plantas. Estas famílias possuem as características habituais dos MFS, tais como, grandes cadeias proteicas (395 - 547 monômeros de aminoácidos) e a presença de dois conjuntos de seis domínios transmembrana, divididos por uma grande região hidrofílica no citoplasma. Estas proteínas catalisam tanto a absorção do nitrato como a saída de nitrito da célula (PAO; PAULSEN; SAIER JR., 1998).

Em plantas superiores, foram identificados dois tipos de transportadores de nitrato do tipo MFS, NRT1 e NRT2 (LEA, 1999). Na família de transportadores NRT1 (sistemas de baixa afinidade LATS), as proteínas são operacionais quando a concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no meio é maior do que 1 mM (GALVAN et al., 1996). Vários estudos termodinâmicos e eletrofísicos demonstram que o transporte ativo do nitrato por estas proteínas é dependente de H<sup>+</sup> (TSAY et al., 1993). Nesta família, a exceção é o gene CHL1 (*AtNRT1.1*), um transportador de nitrato de afinidade dupla,

que possui um mecanismo de controle do modo de ação via fosforilação e desfosforilação da treonina 101 (TSAY et al., 2007). A família NRT2, também chamada de NNP (transportadores NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/ NO<sub>2</sub><sup>-</sup>); são sistemas de alta afinidade cHATS e iHATS, para constitutivo e indutível, respectivamente, também descrito como um sistema de absorção com uma cinética típica de "Michaelis - Menten" (LEA, 1999). É composta por transportadores que são efetivos quando a concentração de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> extracelular é inferior a 200 μM (ZHANG et al., 1999; GALVÁN et al., 1996). Em *Arabidopsis thaliana*, foram identificados 53 genes codificando para NRT1 e 7 genes para as proteínas NRT2 (TSAY et al., 2007). Dois dos genes NRT1 (*CHL1* e *AtNRT1.2*) e dois dos genes *NRT2* (*AtNRT2.1* e *AtNRT2.2*) são conhecidos por estarem envolvidos na absorção de nitrato (TSAY et al., 2007). Em cana-deaçúcar, até o presente momento, estas famílias de transportadores de nitrato ainda não foram caracterizadas.

Devido ao comportamento das famílias de genes dos transportadores de NO<sub>3</sub>, as faixas de concentração utilizadas em diferentes estudos são muito variáveis (FAN et al., 2005; LIU; HUANG; TSAY, 1999). Quando o interesse é definir as atividades (constitutivas e indutíveis) dos sistemas "HATS e LATS", a seleção das faixas de concentrações de NO<sub>3</sub> indutivas é de fundamental importância. Em *A. thaliana* e *Brassica napus*, o sistema "HATS" (constitutivo ou induzível) está ativado quando a disponibilidade de NO<sub>3</sub> é baixa, menor que 1,0 mM. Por outro lado, quando se tem alta disponibilidade [NO<sub>3</sub>] (maior que 1,0 mM), o sistema "LATS" é ativado (FAURE-RABASSE et al., 2002). Em gramíneas, diversos trabalhos estabeleceram faixas de concentrações necessárias para ativar o sistema HATS: entre 10 e 200 μM em cevada (ASLAM; TRAVIS; HUFFAKER, 1992); entre 20 μM /L e 30 μM /L no arroz (FAN et al., 2005); na faixa de 1,0 mM até 50 μM NO<sub>3</sub> no milho (QUAGGIOTTI et al., 2003). Em cana-de-açúcar, para a avaliação da atividade enzimática em duas variedades cultivadas "in vitro" foram utilizadas as concentrações que foram de 0,49 mM, 2,46 mM até 9,83 mM de NO<sub>3</sub> (SABINO-DONATO et al., 2004).

Plântulas que nunca foram expostas à presença de nitrato na solução nutritiva, ao serem colocadas em soluções que apresentam baixas concentrações (0,1 – 1,0 mM) mostram uma baixa capacidade de absorção (ENGELS; MARSCHNER'S, 1995). Essa baixa capacidade de transporte pode ser considerada constitutiva e pode atuar como um mecanismo sensor de NO<sub>3</sub> no ambiente radicular (BEHL; TISCHNER; RASCHKE, 1988; CEREZO et al., 2001). A capacidade de

absorção de nitrato aumenta, grandemente, após a exposição das raízes a concentrações maiores de NO<sub>3</sub>. Ainda é desconhecido, se o desenvolvimento da capacidade de absorção se deve ao aumento no número e na eficiência de transportadores homólogos aos HATS e LATS constitutivos, ou se trata de transportadores, estruturalmente diferentes, que ainda não foram descritos (LEE; DREW, 1986). No entanto, o desenvolvimento de uma taxa acelerada de absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é dependente da duração da exposição e da concentração do nitrato (MARSCHNER'S, 1995). O período de indução necessário para atingir uma taxa de absorção estável pode variar entre as espécies de plantas (MARSCHNER'S, 1995). Em trigo, a máxima capacidade de absorção foi identificada cerca de 10 horas após a aplicação de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (GOYAL; HUFFAKER, 1986). Em milho e cevada, o tempo observado para a estabilização foi de 6 e entre 12 e 24, respectivamente (HOLE et al., 1990).

## 2.8 Enzima nitrato redutase assimilativa aspectos fundamentais

A nitrato redutase assimilativa (NIA) (CE 1.7.1.3) é uma enzima chave do metabolismo do nitrogênio, sendo responsável pela catalisação da redução do nitrato a nitrito. Mesmo tendo sido isolada e caracterizada há mais de 40 anos, novas compreenções da sua estrutura e função são descobertas a cada década de estudo (CAMPBELL, 1996). A NIA atua como um ponto central para a integração do metabolismo de plantas, algas e fungos, onde coordena o fluxo de nitrogênio reduzido através de vários mecanismos de regulação. O monômero da NIA é composto de um polipeptídio de 100-kD, contendo um domínio de ligação do tipo FAD, um domínio ferro heme e um domínio molibdopterina-molibdênio (Mo-MPT). Nesta enzima foram identificados oito segmentos de sequências: (1) uma região "ácida" N-terminal; (2) um domínio Mo-MPT com o sítio ativo de redução do nitrato; (3) um domínio interface; (4) o domínio de união Hinge 1, contendo uma serina fosforilada, com regulação reversível da atividade da proteína inibidora 14-3-3; (5) o domínio citocromo b; (6) Hinge 2; (7) o domínio FAD e (8) o domínio NAD(P)H. O fragmento do citocromo b da NIA contém o sítio ativo onde NAD(P)H transfere elétrons para FAD (CAMPBELL, 1996).

### 2.8.1 Mecanismos Moleculares de Regulação da NIA

Na planta, a capacidade total de redução de nitrato pela NIA é dependente da disponibilidade de substratos no citoplasma (concentrações-base de NAD(P)H e nitrato), do nível de NIA funcional (quantidade de polipeptídio de NIA e disponibilidade de cofatores e íons metálicos - FAD, Fe heme, Mo-MPT, e Mo). O nível total da capacidade de redução de nitrato pela NIA é definido pelo estado geral de metabólitos encontrados na planta, os quais são monitorados, direta e indiretamente, por sensores metabólicos e de vias de transdução de sinal (CAMPBELL, 1996). Nas plantas jovens, em condições ótimas de crescimento e nitrato suficiente, a capacidade de redução de nitrato é cerca de duas vezes maior que a necessidade da planta. Este sistema tem sido chamado de resposta primária (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1991). Tem sido demonstrado que os genes de NIA e a NIR em raízes e folhas são especificamente induzidas por concentrações de nitrato tão baixias quanto 1 µM, com 15 minutos de exposição aos íons. Também nas raízes são induzidos componentes plastídicos associados com o fornecimento da energia e do poder redutor para a assimilação de nitrato e nitrito, isto é, a ferredoxina. ferredoxina redutase. glicose-6-fosfato-desidrogenase, fosfogluconato desidrogenase (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1993; RITCHIE et al., 1994; MATSUMARA et al, 1997;. REDINBAUGH; CAMPBELL, 1998). Além disso, os genes associados com assimilação de amônio e sínteses de aminoácidos nas raízes das plantas são também induzidos a níveis mais elevados de expressão pelo nitrato. A glutamina sintase (GS), glutamato/oxoglutarato amino transferase (GOGAT), carboxilase. fosfoenolpiruvato piruvato-quinase, citrato sintase. isocitrato desidrogenase são os principais genes ativados em resposta a presença de nitrato (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1993; SAKAKIBARA et al, 1997; STITT, 1999). Isto proporciona uma melhor capacidade de sintetizar glutamina e glutamato, provavelmente tanto por um aumento nos níveis de atividade da GS e GOGAT e um aumento na capacidade de produção de ácidos orgânicos, especialmente 2-OG.

Embora certo número de sugestões tenha sido feitas em relação à via de transdução de sinal entre o nitrato e a expressão dos genes de resposta ao nitrato, pouco se sabe sobre o sistema. Há talvez três possíveis "mecanismos" pelos quais o nitrato pode agir. Um deles é que o nitrato se liga a uma proteína receptora na superfície da célula, a qual transmite o sinal para a célula, possivelmente por meio

da proteína G e de uma fosforilação a proteína (CHANDOK; SOPORY, 1996), o que resulta na ativação de um fator de transdução proteico, pelo nitrato. A segunda é que o nitrato entra na célula e se liga a um "receptor" interno que ativa o fator de transdução proteico. E uma terceira possibilidade, que envolve a produção de NO na membrana plasmática (FOYER; NOCTOR, 2003). Em adição à indução de genes metabólicos quando o nitrato é detectado, há certo número de mudanças nas plantas especialmente nas raízes. Estes incluem um aumento da respiração e da estimulação de ramificação na raiz, bem como o desenvolvimento dos pêlos radiculares (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1991; STITT, 1999). Estas respostas secundárias sugerem que o nitrato também induz a expressão de proteínas reguladoras que estimulam mudanças gerais na planta adaptando ela a um 'modo de nitrato' ou estado metabólico. Um destes fatores de regulação podem ser os fatores de transcrição tipo MADS que são induzidos pelo nitrato em raízes de Arabidopsis (ZHANG; FORDE, 1998). No entanto, deve notar-se que, em análise de microarranjos da expressão de genes induzidos por nitrato em Arabidopsis, este gene juntamente com um transportador de amônio foi suprimido por tratamento com doses altas de nitrato (WANG et al., 2000).

O crescimento das raízes laterais é também regulado por um fator de sinalização que vem do ápice da planta que é inibitório e previne o surgimento das raízes laterais quando o nitrato interno da planta é elevado (STITT, 1999). Assim, parece que o efeito local de nitrato como um sinal é o de estimular o desenvolvimento das raízes laterais, mas um efeito substituição é encontrado se o nitrato do tecido está presente em alta concentração.

Já foi definida a sequência de nucleotídeos na qual o fator de transdução induzido pelo nitrato se liga no promotor dos genes da NIA e a NIR. A primeira identificação de um domínio de nitrato foi obtido em estudos do promotor da NIR de espinafre (RASTOGI et al., 1993; 1997). Estudos paralelos com genes da NIA de Arabidopsis usando plantas de tabaco transgênicas revelou regiões com resposta a nitrato, em sequências na região 5' de ambos genes (LIN et al., 1994). Uma análise mais detalhada destas sequências de nucleotídeos dos genes de Arabidopsis que se liga a NIA resultou em uma definição como motivo NP (HWANG et al., 1997). No promotor do gene de Arabidopsis NR1, os nucleotídeos -57 a -46, TTTATTTACTCA, e os nucleotídeos -110 a - 99, ATTAAAAAGTCA, e no promotor NR2, os nucleotídeos -162 a -151, TTAATTAAGTCA, foram mostradas se ligarem

especificamente a proteínas obtidas a partir de extractos nucleares de folhas de tabaco induzidas por nitrato. Além disso, a proteína nuclear de ligação com a primeira sequência de motivo de nitrato NR1 foi constitutivamente expressa em folhas de tabaco (HWANG et al., 1997). Este motivo de nitrato foi identificado em promotores da NIA e NIR a partir de uma variedade de plantas. A sequência geral da motivo de nitrato é uma série de nucleótidos A ou T, seguido por ACTCA ou AGTCA.

Resumindo, o nitrato age como um hormônio vegetal, uma vez que sua aplicação pode provocar alterações fisiológicas e morfológicas na planta (alteração da razão raiz/parte aérea, desenvolvimento dos pelos radiculares etc.) em função da indução da NIA em resposta à disponibilidade do nutriente. O grau de resposta das plantas ao nitrato depende de fatores genéticos e ambientais como luz e disponibilidade de nitrato no substrato (CAMPBELL, 1996). A expressão e a atividade da NIA são controladas pela concentração de NO<sub>3</sub>-, pela presença de metabólitos nitrogenados e carbonados, CO<sub>2</sub>, citocininas e pela luz. Em adição, a enzima está sujeita a modificações pós-translacionais por fosforilação (BUCHANAN et al., 2000; CAMPBELL, 1996).

#### 2.8.2 O controle da atividade NIA

A regulação da NIA é, provavelmente, controlada por mecanismos de fosforilação e desfosforilação de proteínas (KAISER; BRENDLE-BEHNISCH, 1991). Foi demonstrado que a NIA é uma fosfoproteína que apresenta redução de atividade quando as folhas são expostas ao escuro, na presença de cátions divalentes como Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> ou Mg<sub>2</sub><sup>+</sup> e na presença de uma proteína inibidora da ativação (HUBER et al., 1992). A proteína inibidora foi identificada como a proteína de ligação, amplamente distribuída no reino vegetal, chamada de 14-3-3 (BACHMANN et al., 1996). A reativação da NIA na presença de luz depende de um tipo de proteína fosfatase 2A, que catalisa a desfosforilação da NIA.

Além do controle ao nível celular, há também os controles genéticos e ambientais definidos pela localização da NIA no tecido. A variabilidade ecológica da atividade da NIA e sua distribuição nos tecidos vegetais (ANDREWS, 1986; STEWART et al., 1988, 1992), podem ser atribuídas à uma adaptação evolutiva das

plantas ao pH e as formas de N disponíveis nos ambientes naturais (CHEESEMAN; TANKOU, 2004).

## 2.9 Fotossíntese C<sub>4</sub>, nutrição nitrogenada e uso eficiente da água

A fotossíntese C<sub>4</sub> figura entre as inovações mais importantes das plantas na sua evolução desde o Cretáceo (TAYLOR, et al., 2010). É um conjunto coordenado de adaptações anatômicas e fisiológicas pelas quais o CO<sub>2</sub> se concentra em torno da Rubisco, aumentando a eficiência fotossintética C<sub>4</sub> em comparação com as plantas C<sub>3</sub> em altas temperaturas e baixas concentrações de CO<sub>2</sub> na atmosfera (BJORKMAN, 1970). Sessenta por cento de todas as espécies C<sub>4</sub> pertencem à família *Poaceae* que incluem as espécies herbáceas dominantes de savanas tropicais, o milho, a cana-de-açúcar e as espécies importantes para produção de biocombustíveis de segunda geração, o *miscanthus* e switchgrass (SAGE, 2004).

A Rubisco, é a enzima primária da fixação de CO<sub>2</sub> na fotossíntese, é um catalisador pobre nas condições atmosféricas normais da atualidade (ANDREWS; LORIMER, 1987; TCHERKEZ et al., 2006). Espécies com a via fotossintética C<sub>4</sub> desenvolveram um mecanismo bioquímico de concentração de CO<sub>2</sub>, que na maioria das espécies envolve a colaboração de dois tipos de células fotossintetizantes, as células do mesofilo e as da bainha do feixe vascular (LEEGOOD et al., 1997; GHANNOUM et al., 2011).

O CO<sub>2</sub> é inicialmente fixado pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) nas células do mesofilo num ácido de C<sub>4</sub> que então se difundem para as células da bainha entorno dos feixes vasculares onde estão é descarboxilado para fornecer CO<sub>2</sub> para Rubisco (GHANNOUM et al., 2011). Isto permite a Rubisco operar perto do limite da sua atividade máxima. A via fotossintética C<sub>4</sub> evoluiu muitas vezes tanto em dicotiledôneas como em monocotiledôneas (SAGE, 2004). Foram identificados três grandes subgrupos bioquímicos das plantas C<sub>4</sub>, (HATCH et al., 1975). Um utiliza a enzima málica do tipo NADP (NADP-ME) a qual descarboxila o ácido C<sub>4</sub> nos cloroplastos das células da bainha entorno dos feixes vasculares, outro tipo é a NAD-ME que descarboxila o ácido C<sub>4</sub> nas mitocôndrias e o tipo fosfoenolpiruvato carboxicinase (PCK) a que descarboxila o ácido C<sub>4</sub> principalmente no citosol. Estas

variações bioquímicas são acompanhadas por um conjunto de alterações anatômicas e ultraestruturais (HATCH, 1987).

Para compensar as pobres propriedades cinéticas da Rubisco, as plantas C<sub>3</sub> têm altos teores da Rubisco em suas folhas, o que impõe uma considerável exigência de nitrogênio (GHANNOUM et al., 2011). Em plantas C<sub>4</sub>, o mecanismo de concentração de CO<sub>2</sub> aumenta a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> (A) sob condições normais do ar e elevada intensidade de luz, o que aumenta tanto a eficiência fotossintética quanto a utilização do nitrogênio (EFUN, definida como a razão de A por unidade de N na folha) e o uso eficiência da água na folha (W). W é definida como a proporção da A acima da taxa de transpiração da folha), em comparação com as espécies C<sub>3</sub> (GHANNOUM et al., 2011).

As atividades das enzimas fotossintéticas Rubisco e Fosfoenolpiruvato Carboxilase (PEPC) são fortemente dependentes da disponibilidade de nitrogênio, componente principal destas enzimas. Em adição, o nitrogênio também está presente em grande quantidade nas proteínas dos tilacóides, os quais sãos os responsáveis pela regeneração da Rubisco. A soma do nitrogênio presente na Rubisco e nas proteínas dos tilacóides representa mais de 60% do total presente nas folhas (EVANS, 1989; MAKINO; OSMOND, 1991). No milho, o nitrogênio é um fator regulatório essencial, para o estímulo pela luz, da síntese de RNA mensageiro pela Rubisco e pela PEPC (YAMAZAKI et al., 1986). Em folhas de espinafre (C3), o aumento no fornecimento de N foi relacionado com a atividade da Rubisco, com o transporte de elétrons, a produção de ATP e aos teores de clorofila (EVANS; TERASHIMA, 1987). Sage et al. (1987) estudando Amaranthus retrojlexus uma dicotiledônea C<sub>4</sub>, relataram uma diminuição na proporção entre Rubisco e PEPC relacionada ao aumento do teor de N foliar. A disponibilidade de nitrogênio pode alterar significativamente a eficiência fotossintética das plantas C<sub>4</sub>, uma vez que a atividade de carboxilação é função da razão Rubisco: PEPC. Há pouca informação disponível sobre os efeitos do estresse de N em plantas e quase nenhuma informação sobre como o estresse de N influencia a partição da atividade de carboxilação entre Rubisco e PEPC (SAGE et al., 1987).

Em tecidos heterotróficos de plantas C<sub>3</sub>, ou seja, nas sementes e nos frutos, a PEPC desempenha um papel central na reconstituição anaplerótica dos intermediários do ciclo do citrato, fornecendo precursores para diversas vias biossintéticas, incluindo a biossínteses de aminoácidos (CHOLLET et al., 1996). Nos

últimos anos, vários estudos foram realizados visando a manipulação da partição de assimilados em tecidos heterotróficos de plantas C<sub>3</sub> (RADCHUK et al., 2007) ou para melhorar a fixação de CO<sub>2</sub> nos tecidos autotróficos via superexpressão da PEPC (GEHLEN et al., 1996; KU et al., 1999). Em contraste, existem poucos estudos sobre os efeitos da redução da atividade da PEPC na fisiologia das plantas. Em plantas transgênicas de batata (*Solanum tuberosum*), a redução em até 70% da atividade da PEPC não revelou qualquer efeito significativo sobre a planta e no crescimento dos tubérculos (RADEMACHER et al., 2002; GEHLEN et al., 1996). Entretanto, em *Escherichia coli*, estirpes modificadas via *knockout* da PEPC apresentaram uma redução drástica na taxa de crescimento, o que sugere uma função desta enzima no metabolismo celular (PENG et al., 2006; FOYER et al., 2003).

O estudo dos mecanismos regulatórios envolvidos no transporte e assimilação de nitrogênio é de fundamental importância para o aumento da UEN. A caracterização das vias de sinalização implicadas na indução de genes por solutos nitrogenados poderá auxiliar na identificação precisa dos teores de nitrogênio necessários para o bom desenvolvimento da planta. Vários sistemas de sensores de N em potencial foram identificados e podem funcionar através da percepção de aminoácidos específicos dentro da planta. Em bactérias, as concentrações celulares de Glutamina (Gln) sinalizam o estado nutricional de N através da proteína PII. (MOORHEAD; SMITH, 2003). As proteínas PII são proteínas homotriméricas, transdutoras de sinais que detectam os níveis de nitrogênio, carbono e energia na célula e os transmitem para outras proteínas, especialmente àquelas do sistema de regulação de nitrogênio, as Ntr. A proteína GlnD promove a uridililação de GlnB em resposta a baixas concentrações de nitrogênio e o trímero de PII pode ser encontrado na forma mono-; di- ou totalmente uridilizada. As proteínas PII também são capazes de ligar-se ao ATP, ADP e 2-oxoglutarato e de formar heterotrímeros. Acredita-se que a proteína PII sinaliza os teores de carbono e nitrogênio nas bactérias, além de poder regular, diretamente, a atividade de um transportador de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Homólogos vegetais da PII foram identificados em plantas e foi demonstrada uma interação direta com o 2-oxoglutarato (SMITH et al., 2003). A interação proteína-proteína foi descrita entre proteínas tipo-PII e componentes secundários, fornecendo evidências para um sistema semelhante em plantas superiores (SUGIYAMA et al., 2004).

Ao nível celular, o sinal de alteração do estado nutricional da planta é fornecido por uma mudança nos *pools* de N nos diferentes compartimentos, em particular no citosol. Embora as mudanças nas concentrações de aminoácidos do floema possam indicar uma mudança no *status* de N na planta, é no interior das células da raiz onde o sinal de realimentação deve suscitar alterações na absorção de nitrogênio.

Quando o nitrato é absorvido além das necessidades imediatas ocorre o armazenamento na forma de nitrato livre no vacúolo de onde pode vir a ser, posteriormente, remobilizado, quando o suprimento de nitrogênio for insuficiente para atender a demanda (VAN DER LEIJ et al., 1998). O nitrato armazenado nos vacúolos é afetado por vários processos, incluindo as taxas relativas de absorção e redução de nitrato, assimilação e pela absorção incorporada e exportada. Por isso, os produtos dos genes podem influenciar, potencialmente, na variação natural dos níveis do nitrato livre nos tecidos vegetais. Os *pools* de nitrato celular são importantes, tanto para a expansão dos tecidos, quanto para o armazenamento de N durante o crescimento vegetativo (XU et al., 2012). Nesta fase do desenvolvimento, ocorrem as principais perdas por lixiviação, as quais são prejudiciais ao meio ambiente (PENG et al., 2006).

É fundamental a adoção de estratégias governamentais visando o aumento da eficiência do uso do nitrogênio (UEN) para a redução dos efeitos prejudiciais causados ao Homem e ao meio ambiente. Esta estratégia deve abranger tanto os pequenos quanto os grandes produtores rurais, combinando a utilização de tecnologias mais eficientes com políticas locais para contribuir para uma melhor gestão do N; com diretrizes uniformes em níveis regional e nacional, uma política eficaz acarretará na manutenção e no aumento da produtividade a partir da melhoria na eficiência do uso do nitrogênio. Ao nível da planta, será necessário um amplo entendimento das vias metabólicas, enzimas, transportadores e as suas interações e mecanismos reguladores, que irão nortear a definição das diretrizes a serem adotadas para o desenvolvimento de novas tecnologias visando à utilização sustentável do nitrogênio na agricultura.

Já na temática do uso eficiente da água, as plantas vasculares se caracterizam pela integração entre os sistemas de captação e condução, é daí que elas conseguem conjuntar a parte aérea e as raízes, ligando o sistema de captação formado pelas raízes, ao sistema vascular e ao chamado de complexo estomático

formado por as células-guarda, as células subsidiárias e a fenda estomática ao nível foliar (TAIZ; ZEIGER, 2009). A água presente no solo consegue ascender até a atmosfera seguindo estas vias, sei-a através do apoplasto ou pelo simplasto. Em tanto, os nutrientes absorvidos pelas raízes são carregados para a parte aérea pela corrente de transpiração que se movimenta através do xilema (TAIZ; ZEIGER, 2009). Tanto a absorção inicial de nutrientes e água quanto o movimento subsequente dessas substâncias da superfície da raiz, através do córtex, e para dentro do xilema são processos altamente específicos e bem-regulados (TAIZ; ZEIGER, 2009). Na maioria das plantas, o xilema constitui a parte mais longa da rota de transporte de água. Em uma planta de um metro de altura, mais de 99.5% da rota de transporte de água encontra-se dentro do xilema (TAIZ; ZEIGER, 2009). Graças a tal continuidade é que são acoplados o controle estomático, a transpiração foliar e a fotossíntese foliar. Tanto as perdas de água quanto o controle da taxa de absorção de dióxido de carbono, os quais são requisitos necessários para a fixação durante a fotossíntese possuem um acoplamento e coordenação estritamente regulados pela planta. Principalmente pelas células guardas, que são em boa parte encarregadas de perceber e sinalizar: intensidade e qualidade da luz, temperatura, status hídrico foliar e concentração intracelular (Ci) de CO<sub>2</sub> (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A eficiência das plantas em moderar a perda de água, ao mesmo tempo em que permitem absorção suficiente de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese, é definida como a eficiência no uso da água (EUA). As plantas desenvolveram mecanismos e estruturas envolvidos no aumento da EUA e nos mecanismos de concentração de dióxido de carbono, principalmente as que apresentam o metabolismo C<sub>4</sub>. Estas plantas são caracterizadas por apresentarem maior EUA e também pelo uso eficiente do N, principalmente devido à localização e diminuição do conteúdo de nitrogênio proteico da Rubisco, e o aumento das proteínas solúveis e componentes dos tilacóides (GHANNOUM et al., 2011). Assim elas conseguem aumentar a taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> por unidade de nitrogênio na folha (GHANNOUM et al., 2011).

## 2.10 Fisiologias da partição de fotoassimilados e a redução de nitratos

Provavelmente, o aumento na concentração de N orgânico é resultado do acúmulo de moléculas contendo N, principalmente, aminoácidos e proteínas solúveis e insolúveis da membrana, com as proporções relativas dependendo das condições ambientais (MILLARD, 1988; EVANS; SEEMANN, 1989; ANDREWS et al., 1999). A absorção e assimilação de N (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e a síntese de proteínas são processos que requerem energia. Desta maneira, o aumento na concentração de N orgânico reflete em um aumento da proporção de energia derivada do C na fotossíntese, para o processamento do N. Entretanto, o nitrogênio é componente da clorofila e de outras enzimas fotossintéticas e, assim, pode ter influência direta na fotossíntese (LAWLOR, 2002). Um aumento nas taxas de transformação do N origina uma elevação da disponibilidade de fotoassimilados utilizados pela planta para o crescimento, o que proporciona um maior desenvolvimento da parte aérea em relação à raiz (medidas em peso seco), provavelmente, devido à proximidade com a fonte de C e ao aumento do N orgânico disponível para o crescimento (LAWLOR, 2002).

# **3 MATERIAL E MÉTODOS**

## 3.1 Material vegetal

Para avaliar o metabolismo do nitrogênio e do carbono na cana de açúcar, inicialmente foram pré-selecionadas quatro variedades comerciais: RB93-5744, RB72-454, RB83-5089, e SP80-3280. Estas variedades RB foram escolhidas por apresentarem características agronômicas de interesse que são descritas a partir do catalogo de variedades RB de cana-de-açúcar de 2008 (HOFFMANN, et al., 2008) e outras fontes (<a href="http://www.afcrc.com.br">http://www.afcrc.com.br</a>) e a variedade SP80-3280 principalmente pelo sequenciamento de ESTs estar disponível (Vettore et al., 2003). As principais descrições de cada variedade são:

## **Variedade RB93-5744**, (*Genitores: RB835089 x RB765418*)

Aspectos gerais: Desenvolvimento rápido, hábito de crescimento ereto, de fácil despalha, diâmetro de colmo médio-grosso, apresentando coloração marrom esverdeado, com pouca cera e gema triangular.

Recomendações de manejo: Plantar em ambientes de médio a bom potencial; colher no final de safra.

Destaques: Material rústico, excelente sanidade e muito produtivo.

## **Variedade RB72-454**, (*Genitores: CP53-76 x ?*)

Aspectos gerais: Entouceiramento médio, com colmos eretos, empalhados, de diâmetro médio, apresentando coloração verde clara, com mancha de cera escurecida. É sensível quando plantada na época fria, nos solos mais argilosos a variedade é susceptível às condições de estresse hídrico. Com auxílio de maturadores pode ser realizada a colheita da cana-planta antes de julho.

#### **Variedade RB83-5089** (*Genitores: RB72454 x NA56-79*)

Aspectos gerais: Entouceiramento ralo, com colmos eretos, pouco empalhados, de fácil despalha, de diâmetro médio, apresentando coloração esverdeada, que se torna marron quando exposta ao sol, coberta com cera. Recomenda-se plantar em solos arenosos em regiões com disponibilidade de água; colher no meio e final de safra.

## **Variedade SP80-3280** (genitores: SP71-1088 x H57-5028)

Aspectos gerais: Entouceiramento médio, com colmos eretos. Apresenta alta linearidade da produção em relação à melhoria ambiental, além de ótima estabilidade e nível de resposta ao ambiente

# 3.2 O ensaio preliminar

Foi realizado um ensaio preliminar, para avaliar o metabolismo do nitrogênio e do carbono na cana de açúcar e para fazer-se a escolha de duas variedades e os parâmetros que seriam utilizados nos experimentos, nele foram utilizadas as variedades RB72-454, SP80-3280, RB93-5744 RB (desta ultima variedade não foi possível obter material vegetal segundo os requerimentos do experimento e foi substituída pela RB83-5089). Em cada tratamento, foram colocadas apenas quatro plantas por vaso de 5L de cada uma das três variedades para cada um dos tratamentos. Os tratamentos foram definidos com base na solução de HOAGLAND; ARNON (1950), o conjunto dos tratamentos foi escolhido como um múltiplo da Niv1 = 0.0concentração da fórmula original, е foram nomeados como (controle); Niv2 = 0,5 da dose original; Niv3 = 1,0 "dose original"; Niv4 = 1,5 vezes a dose original e Niv5 = 2,0 vezes a dose original (correspondente às concentrações de: 0,0; 7,5; 15,0; 22,5; e 30,0 mM de NO<sub>3</sub>, respectivamente) como é apresentado na tabela 1. Para a instalação do ensaio o primeiro passo foi o tratamento térmico das gemas, seguido do tratamento com fungicida. No mesmo dia 12/11/2009, as gemas tratadas foram colocadas em bandejas com areia de rio lavada, sendo transplantadas nos vasos em 30/12/2009. Todo o experimento foi realizado em casa de vegetação no CEBTEC-ESALQ/USP, Piracicaba, SP.

As doses foram definidas com base em trabalhos publicados por QUAGGIOTTI, et al., 2003; ESPEN, et al., 2004; SABINO-DONATO et al., 2004; LINDQUIST, et al., 2007; TREVISAN et al., 2008; HO, et al., 2009; MASCLAUX-DAUBRESSE; CHARDON, 2011.

Tabela 1 - Soluções de Hoagland e Arnon (1950) modificadas, correspondentes com as concentrações utilizadas no ensaio preliminar das três variedades

	<b>Niv-0,0</b> mL/L	<b>Niv-0,5</b> mL/L	<b>Niv-1,0</b> mL/L	<b>Niv-1,5</b> mL/L	Niv-2,0 mL/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
KNO <sub>3</sub>		2,5	5,0	5,0	5,0
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$		2,5	5,0	5,0	5,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
KČI	5,0	2,5			
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	5,0	2,5			
NaNO₃				7,5	15,0
Micro	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA	<u>10,0</u>	<u>10,0</u>	<u>10,0</u>	<u>10,0</u>	<u>10,0</u>
[NO <sub>3</sub> ] mM	0,0	7,5	15,0	22,5	30,0
ppm N- NO₃ Pressão	0,0	105	210	315	420
Osmótica (atm)	0,764	0,773	0,788	1,318	1,872

Nota: No ensaio preliminar foram feitas alterações na solução de micronutrientes utilizando "MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O" no lugar de "H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O", e por sua vez, 1 mL de estoque de ferro + EDTA foi substituído por 10 mL da solução de ferro + EDTA da formula nutricional de Murashige-Skoog (1962).

## 3.2.1 Escolha do material vegetal

Das variedades do ensaio preliminar foram escolhidas pelas suas características agronômicas as variedades SP80-3280 e RB83-5089, as quais quando comparadas, exibiram contrastes e diferenças, tais como: A RB83-5089, não é exigente em solo, desfavorável na colheita mecânica, apresenta boa brotação de soca, raramente floresce, sua capacidade para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem sido destacada experimentalmente (COELHO et al., 2003; PONTES-XAVIER, 2007), apresenta perfilhamento tardio e em menor quantidade, quando comparada com a SP80-3280 (nos ensaios feitos no CEBTEC). Enquanto que a Variedade SP80-3280: é exigente em solo, boa colheita mecânica, sem restrição na brotação de soca, regularmente floresce, não apresenta bom desempenho na fixação biológica de nitrogênio (FBN) segundo resultados experimentais publicados (PONTES-XAVIER, 2007), e nos ensaios feitos no CEBTEC apresentou maior precocidade e abundancia de perfilhamento (<a href="http://www.afcrc.com.br">http://www.afcrc.com.br</a>). Ainda, a variedade SP 32-3280 foi utilizado na projeto de sequenciamento de ESTs de canade-açúcar (VETTORE et al., 2003).

Para observar a taxa de crescimento, foram escolhidas as variedades RB83-5089 e a SP80-3280 as quais apresentaram maior contraste, para os fins dos

experimentos, tais como alta e baixa capacidade de resposta aos níveis de nitrato estudado, que correspondem a baixo e alto ritmo de crescimento, respectivamente. Estes indicadores apresentam características críticas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio e do carbono.

## 3.3 Procedimentos para estabelecer os experimentos

O material vegetal foi coletado do campo, no período da manhã, aproximadamente 15 dias antes do início de cada experimento. As plantas utilizadas procedem de parcelas estabelecidas no Laboratório de Biotecnologia Agrícola, Departamento de Ciências Biológicas e na Fazenda Areão da ESALQ-USP.

Cada gema meristemática foi obtida cortando-se os internós, numa porção entre 2 a 2,5 cm de comprimento em cada lado da gema. Imediatamente procedeuse ao tratamento térmico (50 ° C durante 30 min.) para controle da bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (BENDA; RICAUD, 1978) e para mitigar os processos de oxidação que ocorrem na área exposta pelos cortes. Em seguida, as superfícies de corte foram tratadas com o fungicida "Cerconil PM" (nome comercial, com componente ativo "tiofanato metílico + clorotalonil") a uma dose de dois gramas por litro (g L<sup>-1</sup>). Finalmente, os nós foram dispostos em bandejas de areia de rio (lavada), orientando as gemas no sentido frontal – longitudinal.

Considerando os possíveis danos pela fermentação do material e para facilitar a drenagem e arejamento das raízes, foi necessário colocar uma pequena camada de pedregulhos no fundo da bandeja. Foram colocados entre 20 e 25 gemas por bandeja. Desde a brotação das gemas até o período necessário para obter uma altura média adequada das plantas de 25 cm deu-se em média um período de 15 dias.

As plantas foram transferidas para vasos com capacidade para 5 L contendo fragmentos de quartzo seguindo uma distribuição totalmente ao acaso nas bancadas. Após o plantio das plantas nestes vasos foi iniciado o processo de irrigação com a solução nutritiva correspondente. Definiu-se uma frequência de quatro irrigações e quatro drenagens por dia de acordo com o programa de horários de irrigação e drenagens apresentado a seguir, enquanto que durante a noite a solução permaneceu no fundo nos vasos, num volume menor quando

comparado ao volume utilizado durante as irrigações no dia. O volume de solução mantido a noite toda representa o primeiro dreno no dia seguinte.

Programa de horários de Irrigação e Drenagens nos experimentos:

Manhã: 8:30-9:30/ 11:30 - 12:30Tarde: 14:30 - 15:30 / 17:30 - 18:30

Noite: 19:00 - 19:30 - mantendo-se até 8:30h

A solução nutritiva utilizada foi obtida a partir da recomendada por Hoagland e Arnon (1950) modificada, tendo o nitrato (NO<sub>3</sub>) como a única fonte de nitrogênio. O pH da solução foi aferida a 6,0 e a pressão osmótica foi dependente do tratamento. Os detalhes de concentrações e nutrientes são apresentados nas tabelas 2 e 3. Em média, o volume inicial por garrafa foi de 600 mL, atingindo até 800 mL no final do experimento. A substituição da solução em cada garrafa foi realizada a cada 5 dias, a fim de evitar possíveis efeitos devidos a alterações na solubilidade dos nutrientes, no pH da solução e no aumento da toxicidade devido ao crescimento de algas.

Para cada experimento, os tratamentos foram agrupados em dois conjuntos, cada um deles apresentando uma faixa de concentrações para as doses de nitrato, sendo nomeados de tratamentos com baixas doses (menores o iguais que 0,75 mM) e tratamentos com altas doses (maiores o iguais que 1,0 mM). O objetivo foi poder acompanhar os processos de absorção, transporte, redução e assimilação que ocorrem nas plantas, portanto os tratamentos utilizados pretenderam se aproximar das concentrações reportadas na literatura tanto para Arabidopsis thaliana, uma espécie "modêlo" melhor conhecida que a cana-de-açúcar (PAULSLEN; SLIWINSKI; SAIER JR., 1998; LEA, 1999; GALVAN; FERNANDEZ., 2001), como também nos resultados publicados para outras gramíneas (QUAGGIOTTI, et al., 2003; ESPEN, et al., 2004; SABINO-DONATO et al., 2004; LINDQUIST, et al., 2007; TREVISAN et al., 2008). Os autores descrevem que o transporte de nitrato é associado a duas famílias de transportadores de membrana e que a cinética deles correlaciona-se com as concentrações de nitrato nas soluções nutritivas colocadas nas avaliações. Assim, temos o sistema de alta afinidade pelo nitrato (HATS pelas siglas em inglês de "High Affinity Transport System") que responde a uma faixa de concentração menor o igual que 0,75 mM, e o sistema de baixa afinidade pelo nitrato (LATS pelas siglas em inglês de "Low Affinity Transport System") que responde a uma faixa de concentrações maior o igual que 1,0 mM. (PAULSEN; SLIWINSKI; SAIER JR., 1998; LEA, 1999; GALVAN et al., 1996).

Tabela 2 - Soluções de Hoagland e Arnon (1950) modificadas, correspondentes com as concentrações para o funcionamento dos sistemas de transporte de nitrato de alta afinidade (HATS), os quais respondem às doses menores ou iguais de 0,75 mM

	Trat - 0,0	Trat – 0,075	Trat - 0,25	Trat - 0,5	Trat – 0,75
	mL L <sup>-1</sup>				
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
$KNO_3$		0,04	0,125	0,25	0,375
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$		0,02	0,063	0,125	0,188
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
KCI	4,96	4,875	4,75	4,625	4,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,98	4,938	4,875	4,812	4,75
$NaNO_3$					
Micro	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fe-EDTA	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
[NO <sub>3</sub> ] Mm	0,0	0,075	0,25	0,5	0,75
$mg/L N- NO_3$	0,0	1,05	3,5	7,0	10,5
Potencial					
Osmótico (atm)	0,7635	0,7678	0,7678	0,7678	0,7678

Nota: Foram feitas as seguintes alterações na solução de micronutrientes "MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O" no lugar de "H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O", e por sua vez, 1 mL de estoque de ferro + EDTA foi substituído por 10 mL da solução de ferro + EDTA de formula nutricional de Murashige-Skoog (1962).

Tabela 3 - Soluções de Hoagland e Arnon (1950) modificadas, correspondentes com as concentrações para o funcionamento dos sistemas de transporte de nitrato de baixa afinidade (LATS), os quais respondem às doses maiores ou iguais a 1,0 mM

allilidade (LATO), os quais respondent as doses maiores od iguais a 1,0 mili							
	Trat- 1,0	Trat – 1,5	Trat - 5,0	Trat – 10,0	Trat – 15,0		
	mL L <sup>-1</sup>						
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
$KNO_3$	0,5	0,75	2,5	5,0	5,0		
Ca(NO3)2.4H2O	0,25	0,38	1,25	2,5	5,0		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0		
KCI	4,5	4,25	2,5				
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4,75	4,63	3,75	2,5			
NaNO <sub>3</sub>							
Micro	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		
Fe-EDTA	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0		
[NO <sub>3</sub> ] mM	1,0	1,5	5,0	10,0	15,0		
mg/L N- NO <sub>3</sub>	14,0	21,0	70,0	140,0	210		
Potencial							
Osmótico (atm)	0,7678	0,7678	0,7678	0,7678	0,7678		

Nota: Foram feitas as seguintes alterações na solução de micronutrientes "MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O" no lugar de "H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O", e por sua vez, 1 mL de estoque de ferro + EDTA foi substituído por 10 mL da solução de ferro + EDTA de formula nutricional de Murashige-Skoog (1962).

## 3.4 Distribuição dos tratamentos

Para distribuir os tratamentos inteiramente ao acaso, em primeiro lugar foram dispostos e numerados os postos nas mesas, seguido pela atribuição de um número para cada um dos vasos, logo colocou-se esses números numa planilha do programa Excel e gerou-se o conjunto de números aleatórios, que foram sorteados em relação aos números assinalados nas mesas. Os vasos com quartzo foram colocados nessas posições sorteadas dias antes do transplante das plantas. Para facilitar as análises realizadas, as variedades foram transplantas em dias diferentes dependendo do crescimento, sendo que as plantas RB83-5089 que tem crescimento mais rápido foram transplantadas primeiramente. Referente ao fotoperíodo, as plantas receberam uma média de 14 horas de luz, durante o período de crescimento na casa de vegetação.

## 3.5 Sistema hidropônico

O sistema hidropônico utilizado foi uma adaptação para cana-de-açúcar nas condições do experimento, tendo como modelo o sistema utilizado no Laboratório de Solos e Nutrição de Plantas do Departamento de Ciência do Solo da ESALQ/USP sob a responsabilidade do Prof. Quirino Augusto de Camargo Carmello que orientou o estabelecimento do sistema de hidroponia.

O modelo dos vasos utilizados e do sistema como um todo (figura 1) foi elaborado a partir de baldes plásticos com capacidade para 5,0 quilogramas (kg), revestidos com isolante plástico ou sacos de plástico (poliestireno) para impedir a passagem de luz para as raízes e, assim, prevenir a proliferação de algas (a partir do campo). As plantas foram cultivadas em média com 4,5 kg de quartzo moído utilizado como substrato inerte (tamanho médio, segundo as especificações do fornecedor). Os vasos foram drenados através de um tubo (5,0 mm de diâmetro), colocado num orifício (4,8 mm de diâmetro), perfurado a 1,0 cm do fundo do vaso, pelo qual a solução nutritiva foi evacuada em cada ciclo de irrigação, e logo, aplicada manualmente na parte de acima do recipiente. A montagem das garrafas de um litro de capacidade (coloração âmbar) precisou da colocação de um suporte situado na mesa para pendurá-las (Figura 1).

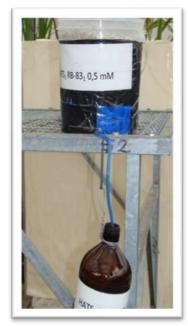


Figura 1 - Sistema vaso - garrafa para armazenar e repor a solução nutritiva para os vasos no sistema hidropônico utilizado

## 3.6 Preparação da solução nutritiva

Os cálculos das concentrações individuais dos nutrientes que compõem cada tratamento foram feitos com base nas tabelas 1 e 2. Na preparação das soluções, foram utilizadas soluções estoque a 1,0 molar (M), como indicado pelos autores no protocolo original (HOAGLAND; ARNON, 1950). A única mudança na receita original foi a adição de molibdato de sódio "MoO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O" no lugar de ácido molíbdico (H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O), no ensaio preliminar, que foi substituído em todos os experimentos. O pH igual a 6,0 para cada tratamento foi aferido utilizando-se um medidor de pH marca Digimed, modelo DM2. As trocas de solução em cada sistema (vaso - garrafa) foram realizadas durante a noite para evitar um possível estresse das plantas.

## 3.7 Coleta dos experimentos e análise dos resultados

A escolha do período de avaliação foi baseada na opinião de vários autores (HUMBERT, 1963; SUBIRÓS-RUIZ, 1995; Cheavegatti-Gianotto, 2011), que reconhecem os primeiros 90 dias no ciclo de vida da cana-de-açúcar, como o período para o estabelecimento do sistema radicular que surgiram nos primórdios localizados na base da nova planta. Para os fins deste experimento as avaliações foram feitas nos primeiros 40 a 60 dias.

O requisito fundamental para o dia de coleta foi estar ensolarado. As plantas foram agrupadas por variedade com as suas repetições de cada tratamento. As folhas +3 (subdividida cada folha em três partes e se utilizo cada parte para cada determinação) de cada planta e as raízes foram coletas. As primeiras plantas coletadas foram às plantas que pertenciam aos tratamentos com a maior concentração de nitrato. Esta decisão baseou-se no maior desenvolvimento alcançado por estas plantas, quando comparadas ao restante das plantas e, portanto, tinham um maior risco de estresse, em comparação com o grupo de plantas tratadas com concentrações mais baixas de nitrato.

A folha +3 ao ser coletada e serem dividida em três partes, foi utilizada do modo seguinte: a extremidade distante da base foliar foi utilizada para a determinação do teor de clorofila; a porção média, para se uso extrair os discos da determinação de atividade da enzima nitrato redutase assimilativa (NIA) e a porção da base foliar foi utilizada para a extração de RNA total. Com exceção da porção usada de imediato para testar a atividade da enzima NIA, o restante dos tecidos foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80 °C até serem utilizados.

Por outro lado, a coleta de raízes para a análise, foi dirigida para separar as raízes finas, com ênfase no segmento próximo ao extremo da raiz. Para determinar a atividade da NIA, as raízes foram cortadas e colocadas em envelopes de papel e conservadas em gelo até serem analisadas. Outra porção foi coletada e congelada em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até ser utilizada durante a extração de RNA total.

#### 3.8 Atividade da enzima nitrato redutase em folhas e raízes

A determinação da atividade da enzima nitrato redutase assimilativa foi baseada nos conceitos de BEEVERS; HAGEMAN, 1969. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Laboratório de Biotecnologia Agrícola do Departamento de Ciências Biológicas, ESALQ/USP. As amostras coletadas foram colocadas em sacos de papel, armazenadas em caixa de isopor com gelo até serem processadas no mesmo dia da coleta.

Uma reta padrão foi feita com NaNO<sub>2</sub> 10 µM (substrato). O controle para esta reta foi feito com uma solução de substrato tamponado (sem discos de folhas, nem raízes) (RADIN, 1974).

Para os experimentos, foram utilizados discos de folhas obtidos com perfurador de 0,5 cm de diâmetro, pesados na quantidade de aproximadamente 50 mg ( $\pm$  10 discos) numa balança analítica UMARK, modelo 210 A classe II. O conjunto de discos foi transferido para tubos de ensaio envoltos com folhas de papel alumínio. Incubados a 37°C por 60 min com 5,0 mL de substrato tamponado a pH = 7,4 (KNO $_3$  200 mM em Tampão PO $_4$  50 mM). Após o período de incubação, a reação foi paralisada adicionando-se 1 mL de Sulfanilamida 1% em HCl 2 N. Em seguida, adicionou-se 1 mL de uma solução de  $\alpha$ -naftilenodiamina 0,05%. Os tubos foram agitados num vortex por 5 segundos e esperou-se 10 min. para a reação cromogênica. Decorrido o tempo foram feitas as leituras de absorbância num espectrofotômetro Ultrospec, modelo 2100pro a 540 nm de comprimento de onda. Os registros das leituras de absorbância, junto com as massas dos discos e raízes foram expressos como  $\mu$ M NaNO $_2$  h $^{-1}$  g $^{-1}$  MF (massa fresca) seguindo os cálculos a partir da reta padrão.

#### 3.9 Experimento 1

Com o objetivo de avaliar os efeitos de diferentes doses de nitrato adicionado às plantas de cana-de-açúcar relacionado aos padrões bioquímicos da atividade enzimática da nitrato redutase assimilativa e aos efeitos fisiológicos de troca gasosa, fixação de CO<sub>2</sub> e eficiência do uso da água foi realizado um experimento testando-se

concentrações baixas e altas de nitrato em sistema de hidroponia, como já descrito anteriormente.

As doses testadas foram: 0,0 (controle); 0,075; 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5; 5,0; 10,0 e 15,0 mM de NO<sub>3</sub> em duas variedades (RB83-5089 e SP80-3280). Para as condições experimentais estabelecidas, considerou-se que a faixa entre 0.075 a 0,75 mM de NO<sub>3</sub> como concentrações menores, enquanto a faixa entre 1,0 a 15,0 mM de NO<sub>3</sub> como concentrações maiores (LEA, 1999; GALVAN et al., 2001). Foram feitas 4 repetições dos tratamentos para as duas variedades, conforme esquema da figura 2, que descreve os aspetos gerais deste primeiro experimento.

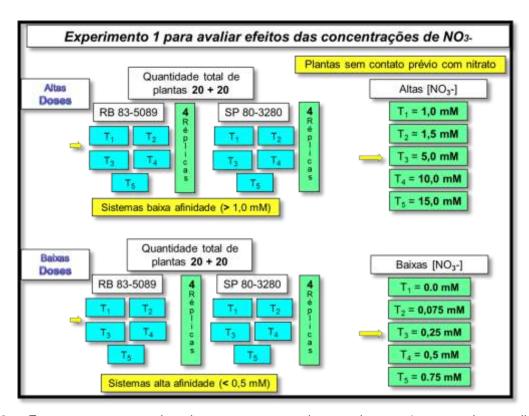


Figura 2 - Esquema representativo dos componentes do experimento 1, no qual a avaliação nutricional das duas variedades foi feita com tratamentos cujas concentrações de nitrato estão ligadas ao funcionamento dos sistemas de transporte de nitrato, tratamentos nomeados de baixa (faixa de 0,0 até 0,75 mM) e alta (faixa de 1,0 ate 15,0 mM) concentrações de NO<sub>3</sub>

Este experimento foi instalado em 11/08/2011 e mantido por 38 dias, com regas em periodicidade apresentada anteriormente no item 3.3.

Durante o experimento 1 para avaliar o efeito das doses de NO<sub>3</sub>, foram feitas as medições dos indicadores de fotossíntese (descritos a seguir), pela sua importância na formação e distribuição da matéria seca (NAVA et al., 2009).

As variáveis de resposta escolhidas foram:

- Taxa de assimilação fotossintética (A) expressa em: µmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>
- Taxa de transpiração (E) expressa em: mol de H<sub>2</sub>O m s<sup>-1</sup>
- Índice de eficiência do uso da água na folha avaliada (A/E)
- Condutância estomática (Gs) expressa em: mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>
- Concentração subestomática de CO<sub>2</sub> (Ci) µmol de CO<sub>2</sub> mol de ar <sup>-1</sup>
- Concentração de CO<sub>2</sub> subestomática/pressão de CO<sub>2</sub> corrigido (Ci/Can)

As leituras foram realizadas na folha + 3 de cada planta. Neste primeiro experimento, foram realizadas duas leituras, uma no dia 02/09/2011 e a seguinte antes da coleta no dia 11/09/2011, no horário de 11:00 até às 14:00 horas. As trocas gasosas foram avaliadas com um analisador de gases por infravermelho (IRGA) LICOR 6400. O aparelho é capaz de controlar variáveis ambientais, tais como a concentração de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, fluxos de entrada e de saída de ar na câmara, temperatura na superfície da folha e luz incidente (http://www.licor.com). Nas condições experimentais pré-definidas, as avaliações dos indicadores fotossintéticos foram realizados com uma densidade de fluxo de fótons de 1000 [μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>] e uma concentração externa de CO<sub>2</sub> de 400 μmol. mol<sup>-1</sup>.

#### 3.10 Experimento 2

Este experimento foi estabelecido somente para a variedade SP80-3280 para conferir as variabilidades encontradas no experimento 1. Para tanto, aumentou-se para duas plantas por vaso, mantendo-se as 4 repetições por tratamento.

O experimento foi instalado no dia 08/10/2011, colocando-se as gemas nas bandejas de areia. O transplante para vasos foi realizado no dia 24/10/2011 e a coleta foi feita no dia 07/09/2011 (44 dias após o transplante para os vasos).

Neste experimento, foram realizados 8 tratamentos: 0,0 (controle); 0,05; 0,1; 1,0; 2,5; 5,0; 15,0 e 25,0 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Foram preparadas quatro repetições (vasos por tratamento) com duas (2) plantas por vaso.

Foi analisada a atividade da enzima redutase de nitrato de folhas e raízes nas doses baixas e altas de nitrato.

## 3.11 Experimento 3

Este experimento teve como objetivo avaliar a eficácia das descrições fisiológicas das variedades, através de medidas repetidas dos indicadores de fotossíntese, por médio das seguintes variáveis:

- a) Fixação de CO<sub>2</sub> e eficiência do uso da água em termos de acúmulo de matéria seca;
- b) Conteúdo e proporção das clorofilas "a" e "b";
- c) Padrões de atividade da nitrato redutase assimilativa em folha e raiz, acompanhado pelas leituras repetidas dos indicadores de fotossíntese e as avaliações do acúmulo de massa seca e índice de massa, ao final da fase de desenvolvimento avaliada.

O experimento foi instalado nos vasos no dia 03/03/2012 para a variedade RB83-5089 e no dia 04/03/2012 para a variedade SP80-3280. As coletas foram feitas entre os dias 12/04 e 19/04/ 2012 (39 a 46 dias após o plantio).

Foram analisados 10 tratamentos: 0,0 (controle); 0,05; 0,1; 0,25, 0,5, 1,0, 2,5; 5,0; 10,0; 15,0 e 25,0 mM de  $NO_3^-$ , com as duas variedades de cana-de-açúcar selecionadas (RB83-5089 e SP80-3280). O experimento teve 4 repetições com uma planta por vaso.

As medições de fotossíntese foram realizadas para avaliar o efeito das doses de NO<sub>3</sub>, conforme foram descritas no experimento 1 utilizando-se o equipamento LCpro+. Além análises IRGA's modelo das assimilação fotossintética (A); taxa de transpiração (E); Índice de eficiência no uso água folha avaliada (A/E); condutância concentração subestomática de CO<sub>2</sub> (Ci); diferencial de concentração de CO<sub>2</sub> na câmara (c) e a razão da concentração de CO2 subestomática/pressão de CO2 corrigido (Ci/Can).

A programação seguida no cronograma das leituras com o IRGAs foi estabelecida e está sendo apresentada na tabela 4.

Tabela 4 -	Cronograma das leituras das variáveis de troca gasosa, fixação de CO <sub>2</sub> e economia de
	água para o período de 42 dias compreendidos entre 08 de março e 11 de abril de 2012

SP80-3280	RB83-5089
08 / 03 / 2012	09 / 03 / 2012
13 / 03 / 2012	14/ 03 / 2012
19 / 03 / 2012	20 / 03 / 2012
23 / 03 / 2012	26 / 03 / 2012
28 / 03 / 2012	30 / 03 / 2012
02 / 04 / 2012	03 / 04 / 2012
09 / 04 / 2012	04 / 04 / 2012
	11 / 04 / 2012

A análise dos resultados coletados se diferencia do procedimento seguido no experimento 1, devido ao fato de ter incrementado o número de leituras no registro acumulativo (medidas repetidas que introduzem o fator "tempo" além das doses e as variedades) das variáveis de fotossíntese, por isso, o processamento estatístico para o análise de variância foi baseado no procedimento GLIMMIX, um modelo linear misto generalizado (com relação aos efeitos fixos e aleatórios) no programa SAS® 9,2.

# 3.11.1 Determinações da massa fresca e seca da parte aérea e raízes, e índice de massa da parte aérea e raízes

Na determinação de massa fresca e massa seca, foi necessário um processo de limpeza das raízes, para remover o quartzo que se aderiu durante o período de crescimento. Para tanto, as raízes foram lavadas cuidadosamente com água destilada, e depois colocadas em papel de filtro até serem pesadas e colocadas em sacos de papel. Em seguida foram submetidas à secagem numa estufa a 60 °C durante 72 horas.

Além das raízes, o conjunto de folhas e colmos, chamado como parte aérea foi coletado e cortado em pequenas porções, colocados em sacos de papel, para o registro da massa fresca e subsequentemente para o tratamento na estufa. A massa fresca e a massa seca da parte aérea e das raízes foram determinadas em uma balança digital Marte modelo AL500. O índice de massa da parte aérea e o índice de massa das raízes foram definidos utilizando os valores da massa fresca e a massa seca, e o cálculo foi realizado subtraindo-se o valor da massa seca do valor da massa fresca, e dividido pela massa fresca seguido pela multiplicado por 100, para obter a porcentagem de umidade nos tecidos.

## 3.11.2 Determinação do conteúdo de clorofilas "a", "b", total e da razão "a/b"

A análise foi baseada na metodologia modificada de LEE et al. (1990). Foram avaliados aproximadamente 20 discos foliares totalizando 0,1 g, de material vegetal de cada amostra. Estes discos foliares foram incubados à temperatura ambiente em tubos de vidro com tampa plástica contendo 1,0 ml de N,N-Dimetilformamida durante 72 h, permanecendo no escuro. Após este período, os pigmentos diluídos na solução foram lidos em espectrofotômetro Ultrospec, modelo 2100pro, a 645 e 663 ηm, sendo utilizados os cálculos contidos na Tabela 5.

Tabela 5 – Cálculos utilizados para determinar a quantidade de Clorofila "a", clorofila "b" e Clorofila Total de cada amostra

	de onda (ηm)	Quantidade de pigmento (g/L)
645	Clorofila "a"	0,0127 * Abs 663 <sub>ηm</sub> – 0,00269 * Abs 645 <sub>ηm</sub>
663	Clorofila "b"	$0.0229 * Abs 645_{\eta m} - 0.00468 * Abs 663_{\eta m}$
Clorofi	la Total	Clorofila "a" + Clorofila "b"

Foram feitos análises de regressão linear simples entre as variáveis de clorofila (conteúdo de clorofila "a", "b", total e razão "a/b") colocadas como fator frente aos resultados da ultima leitura das 8 variáveis indicadoras de fotossíntese: taxa de assimilação fotossintética (A); condutância estomática (Gs); razão A/Gs; taxa de transpiração (E); índice de eficiência do uso da água (A/E); diferencial de concentração de CO2 na câmara (c); concentração subestomática de CO2 (Ci); concentração de CO2 subestomática/pressão de CO2 corrigido (Ci/Can). Junto com os resultados das 8 variáveis obtidas no final do experimento, a saber: atividade da enzima nitrato redutase em folhas (NIA\_F); atividade da enzima nitrato redutase em raiz (NIA\_R); massa seca da parte aérea (MS\_F); massa seca das raízes (MS\_R); razão da massa seca das raízes / massa seca da parte aérea (MS\_R/ MS\_F); massa seca total (MS\_R + MS\_F) e o índice de massa da parte aérea (IMF). Manteve-se a separação das duas faixas de doses e apresentou-se nas tabelas os valores da r² ou em sua falta, o p-valor calculado quando a regressão não fosse significativa a o nível de 0,05.

## 3.12 Análises bioinformática para estudos de expressão em genes candidatos

Foi realizada a busca para obter as sequências dos genes identificados como transportadores de nitrato em espécies de plantas relacionadas com cana-de-açúcar como milho (*Zea mayz*), Sorgo (*Sorghum bicolor*) e arroz (*Oryza sativa*) e a espécie *Arabidopsis thaliana*. Com o objetivo de se identificar e analisar as sequências dos genes candidatos (*Nrt1*, *Nrt2- Nra*, *Nia* e *Gs2*) na cana-de-açúcar. As primeiras buscas foram feitas no banco de dados do NCBI (Uni-Gene), sequências destas espécies foram encontradas pelos respectivos códigos de acesso, transformada para o formato "FASTA", para logo serem comparadas com sequências tipo "EST's" dentro do transcriptoma da cana-de-açúcar.

Também, buscas foram realizadas em outros bancos de dados disponíveis (Tair, Phytozome, DFCI, MGRC, entre outros). A continuidade deste trabalho pretende identificar as sequências homólogas e será realizado análise de expressão e a caracterização destas famílias em cana-de-açúcar. Futuramente, espera-se obter a clonagem e a análise funcional dos genes selecionados.

## 3.13 Extração de RNA total por "pull" de replicas usando TRIzol

Foi seguido um protocolo de extração de RNA total (www.invitrogen.com) para volumeis menores (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). Para o manejo das amostras, em cada experimento as replicas das distintas doses (nas duas faixas aplicadas) por variedade, foram juntadas para formar um "pull" que representa as respostas da variedade quando submetida às doses avaliadas nas condições experimentais colocadas na casa de vegetação.

## 3.14 Tratamento estatístico dos resultados

Todos os resultados das variáveis de resposta obtidas nas análises foram ajustados ao delineamento inteiramente casualizado. Cada vaso, com número de plantas entre 1 e 2 dependendo do experimento foi considerado como uma unidade experimental (parcela).

A comparação para estabelecer as diferenças entre as médias obtidas foi feita pelo teste de Tukey (p<0.05), no caso das regressões e pelo teste de Tukey – Kramer (p<0.05), para as leituras de fotossíntese.

Todos foram ajustados ao modelo matemático geral:  $y_{ij} = m + t_i + e_{ij}$ Onde:

yij seria qualquer variável de resposta

ti tratamentos com i níveis ou dose de nitrato

eij erro experimental ou desvio, com "i" níveis de tratamento e "j" repetições (CAMPOS, 1984; PIMENTEL-GOMES, 1985).

A análise dos resultados dos experimentos foi dividida em função do registro e processamento das variáveis em cada experimento. Para resultados de registro cumulativo, como os obtidos nas leituras de indicadores da fotossíntese (medidas repetidas), foi utilizado um modelo de regressão linear polinomial de efeitos quadráticos no experimento 1 (KENWARD; ROGER, 1997) e o procedimento GLIMMIX do SAS 9,2, (SAS Institute Inc, 2008), no experimento 3, no qual definiu-se tratamento, tempo e tratamento\*tempo como os efeitos fixos e a sua vez a planta como efeito aleatório. A distribuição de resposta escolhida foi do tipo Gaussiano. O ajuste estatístico utilizado foi a estimativa da máxima verossimilhança restrita pelo critério de Akaike ("Akaike's Information Criterion" AIC) para o modelo autoregressivo e os estimadores dos parâmetros de covariância por meio de análise de resíduos (AKAIKE, 1973; SAS Institute Inc, 2008). As diferenças de quadrados mínimos para a média entre os tratamentos foram avaliadas por comparação múltipla de Tukey - Kramer. Este último, em processos convencionais de um fator de classificação do teste F, que tem mais de dois níveis, a análise só consegue indicar que os efeitos de nível são significativamente diferentes entre eles, mas não com respeito aos efeitos de outros níveis (Tukey, 1957; SAS Institute Inc, 2008).

Na coleta do material vegetal de todos os experimentos foram realizadas as análises da nitrato redutase assimilativa, em todos eles os resultados foram calculados a partir da curva de calibração. Para os resultados das variáveis de resposta obtidas das análises feitas no final do experimento (atividade da enzima nitrato redutase, determinações de massa fresca, massa seca e índices de massa, assim como de conteúdo e razão das clorofilas), foi utilizada a análise de regressão linear simples pelo procedimento REG do SAS 9,2. Para a definição dos gráficos e

as retas de melhor ajuste nestas variáveis foi utilizado o programa R 2.15.0. (<a href="http://www.r-project.org">http://www.r-project.org</a>).

Para avaliar os resultados da atividade da enzima nitrato redutase, na comparação das médias das duas variedades, no experimento 3, os cálculos foram feitos no programa ASSISTAT Versão 7.6 beta 2012. Nesse mesmo experimento para o processamento do índice de massa (da parte aérea e raízes) e a obtenção dos resultados desta variável, o cálculo incluiu a transformação dos resultados para o arco seno da raiz de "x" sobre 100, sendo os cálculos foram feitos no programa ASSISTAT Versão 7.6 beta 2012 (o mesmo que utilizado nos cálculos de outras variáveis e que são apresentadas nas tabelas de 11 a 16; 19 a 24 e 28 a 33).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O ensaio preliminar consistiu-se de 5 tratamentos, 3 variedades, e 4 repetições (1 planta) cada. Os tratamentos foram definidos com base na solução de HOAGLAND; ARNON (1950), o conjunto dos tratamentos foi escolhido como um múltiplo da concentração da fórmula original, e foram nomeados como Niv1 = 0,0 (controle); Niv2 = 0,5 da dose original; Niv3 = 1,0 "dose original"; Niv4 = 1,5 vezes a dose original e Niv5 = 2,0 vezes a dose original (correspondente às concentrações de: 0,0; 7,5; 15,0; 22,5; e 30,0 mM de NO<sub>3</sub>-, respectivamente) como é apresentado na tabela 1.

Os resultados da atividade da nitrato redutase nas folhas apresentam que a variedade que mais se destacou foi a RB93-5744, apresentando a maior tolerância às doses elevadas de nitrato, seguida pela RB72-454 que apresentou um desempenho intermediário, sendo que a SP80-3280 exibiu sensibilidade frente às doses maiores de nitrato, com marcadas quedas nas doses Niv4 (22,5 mM) e Niv5 (30,0 mM), como pode-se observar na tabela 6. Para os resultados da atividade da nitrato redutase nas raízes, o melhor desempenho geral foi para a RB72-454, seguida pela SP80-3280. Neste caso, a maior sensibilidade às doses altas foi manifestada pela variedade RB93-5744 para o Niv4 (22,5 mM) e o Niv5 (30,0 mM), quando comparada com as outras duas variedades (Tabela 7). Para todas as variedades, os resultados da atividade da enzima nas folhas foram maiores que os valores de atividade obtidos nas raízes.

Tabela 6- Resultados das médias das 4 plantas avaliadas na atividade da enzima nitrato redutase em folhas das 3 variedades submetidas às doses de nitrato no ensaio preliminar

Doses	RB72-454	RB93-5744	SP80-3280
0,0 mM	7,64	29,46	6,0
7,5 mM	26,17	71,04	30,41
15,0 mM	78,45	101,54	127,80
22,5 mM	64,60	138,53	53,65
30,0 mM	235,24	243,10	11,51

Tabela 7-	Resultados das médias das 4 plantas avaliadas na atividade da enzima nitrato redutase
	em raiz das 3 variedades submetidas às doses de nitrato no ensaio preliminar

Doses	RB72-454	RB93-5744	SP80-3280
0,0 mM	18,83	17,61	19,00
7,5 mM	31,08	20,88	15,36
15,0 mM	21,51	16,18	16,44
22,5 mM	64,30	10,84	26,05
30,0 mM	16,24	12,42	14,66

As características agronômicas das variedades (RB72-454, SP80-3280, RB93-5744 e RB83-5089) e os padrões de crescimento que elas apresentaram no ensaio preliminar realizado em casa de vegetação em sistema de hidroponia permitiu escolher as variedades RB83-5089 e SP80-3280 (é oportuno apontar que não houve possibilidades de obter material vegetal da variedade RB93-5744 e mesma foi substituída pela RB 83-5089 considerando-se que possuem características comportamentais de campo semelhantes).

A variedade SP80-3280 tem sido descrita pelos técnicos como responsiva e de bom desempenho na soqueira, adapta-se bem a solos de fertilidade de média para alta, e para a colheita, sua faixa fica entre os meses de junho a agosto (http://www.afcrc.com.br).

Por sua vez, a variedade RB83-5089 é apresentada como estável e com boa adaptabilidade, com bom comportamento em solos de media a baixa fertilidade (http://www.afcrc.com.br), tendo sido destacada devido ao seu potencial para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), segundo resultados reportados por COELHO et al., (2003), e PONTES-XAVIER (2007), e informações obtidas em comunicação pessoal feita pela Dra. Adriana S. Hermerly. Avaliações feitas sinalizam que esta variedade consegue aportes que vem da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em volta de 43 kg de nitrogênio por hectare, junto com rendimento de 99 toneladas por hectare. No entanto, os autores advertem que dentro dos aspectos a serem observados quando se trata da FBN em espécies não leguminosas é o forte efeito que o genótipo da planta pode exercer sobre a eficiência da fixação de N (REIS JÚNIOR et al., 2000).

Com base nas características acima apresentadas e pelo desempenho em casa-de-vegetação em hidroponia, as variedades RB83-5089 e SP80-3280 foram incluídas neste trabalho.

As duas variedades, quando foram colocadas juntas no período da avaliação mostraram padrões particulares de desenvolvimento. Dentre as características analisadas, a altura da planta foi visualmente maior na variedade RB83-5089, mas que por outro lado no perfilhamento a SP80-3280, foi a que apresentou maior precocidade e um perfilhamento visualmente maior.

## 4.1. Experimento 1.

Quando as variedades foram comparadas nas doses baixas não houve diferenças significativas para a atividade da nitrato redutase nas folhas entre 4 dos tratamentos, com a exceção do controle. As diferenças entre as variedades se apresentaram na atividade das raízes em todos os tratamentos (tabela 8). Na comparação das doses altas houve diferenças significativas em dois dos cinco tratamentos, com maior atividade na variedade RB83-5089 (tabela 9).

Tabela 8 - Comparação das médias para atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, quando as duas variedades foram submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato

	Nitrato Redutase Folha				Nitrato Redutase Raízes			
	Will also Redutase Forma			Milat				
Doses	SP80-3280		RB83-5089		SP80-3280		RB83-5089	-
0,0 mM	7.1710	b	12.2325	а	5.6252	b	9.7689	а
0,075 mM	8.6567	а	5.9195	а	5.7010	b	9.1238	а
0,25 mM	5.7886	а	3.7273	а	6.7241	b	9.5226	а
0,5 mM	7.6400	а	6.1252	а	7.3496	b	11.0451	а
0,75 mM	8.2944	а	5.9101	а	5.1952	b	11.6278	а

CV% = 42.01

CV% = 23.45 / Fator variedade \*\* significativo

ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

Tabela 9 - Comparação das médias para atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, quando as duas variedades foram submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato

	ue milialo							
	Nitrato Redutase Folha			Nitrato Redutase Raízes				
Doses	SP80-3280		RB83-5089		SP80-3280		RB83-5089	
1,0 mM	14.1194	а	14.4042	а	9.2522	а	9.0067	а
1,5 mM	7.5696	b	15.5182	а	6.0025	а	11.8602	а
5,0 mM	9.4638	b	17.4882	а	12.9949	а	10.4909	а
10,0 mM	17.1083	а	18.4521	а	21.4999	а	26.5834	а
15,0 mM	10.9245	а	18.1420	а	45.4663	а	29.8584	а

CV% = 38.34

CV% = 71.07 Fator variedade \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

O gráfico da regressão da atividade da nitrato redutase nas folhas, com uma r² de 0,21 descreve a grande dispersão dos valores de atividade da enzima (tendência que vem dos coeficientes de variação) na variedade RB83-5089, principalmente nas doses 5,0 e 10,0 mM (figura 3), o que não resultou numa variação significativa das médias de atividade nas doses, segundo as tabelas 8 e 9. O resultado da regressão para a atividade da nitrato redutase em raiz para as doses altas na variedade RB83-5089, obteve o r² significativo de 0,76, o qual assinala que a variedade respondeu em correspondência com a elevação das doses às quais foi submetida (Figura 4).

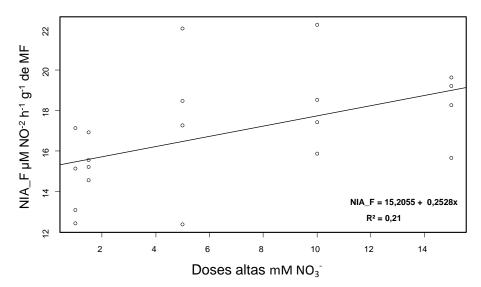


Figura 3 - Reta de regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em folha, na RB83-5089 submetida a doses altas

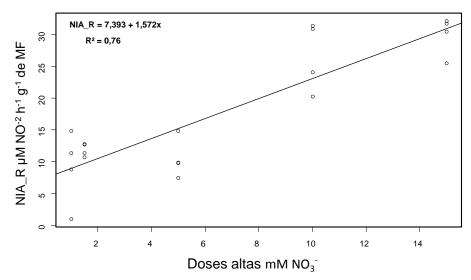


Figura 4 - Reta de regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz, na RB83-5089 submetida a doses altas

Para a variedade RB83-5089, o gráfico de regressão da atividade nas raízes submetidas às doses baixas (figura 5) permite apreciar uma dispersão maior que nas doses altas e com uma r² de 0,29, descreve que o efeito das doses baixas no caso das raízes, afetou a resposta da planta quando comparado com a tendência dispersiva e a significância dos resultados do coeficiente de regressão (figura 4), para a atividade da nitrato redutase nas raízes da mesma variedade submetidas às doses altas de nitrato.

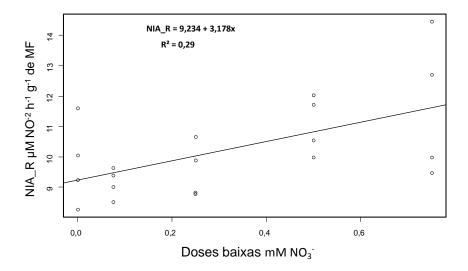


Figura 5 - Reta de regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz, na RB83-5089 submetida a doses baixas

Ao se calcular a atividade da nitrato redutase nas folhas da variedade SP80-3280, não se encontrou valor significativo no coeficiente de regressão. Esta variedade apresentou uma melhor tendência na atividade da nitrato redutase em raiz, para as doses altas, com  $r^2 = 0.38$ . (figura 6).

Nessa mesma variedade, quando foram avaliadas as médias de atividade da nitrato redutase em raiz para as doses altas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 95%, somente a dose 15,0 mM, se diferenciou significativamente das outras quatro, mas as doses 10,0 e 5,0 mM mantiveram a tendência de acompanhar os acréscimos nas doses de nitrato, sendo exceção foram as doses 1,0 mM e 1,5 mM, (tabela 10).

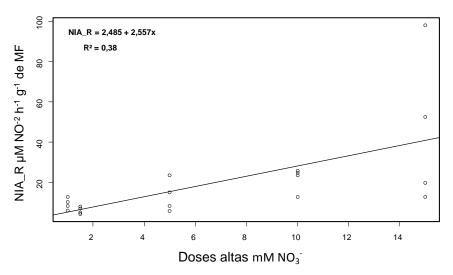


Figura 6 - Regressão da atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz, na SP80-3280, submetida a doses altas

Tabela 10 - Comparação de médias da atividade NIA em raízes na variedade SP80-3280, pelo teste de Tukey para o nível de confiança de 95%

Media de atividade da nitrato redutase em raiz				
20,46	а			
18,37	ab			
16,32	ab			
15,52	b			
14,23	b			
	20,46 18,37 16,32 15,52			

Coeficiente de variação 11,62%

No final deste experimento ficou evidente pelos resultados que o desempenho a da atividade da nitrato redutase tanto em folha como em raízes obtido na variedade SP80-3280, não foram comparáveis com os da variedade RB83-5089, principalmente na atividade da enzima nas raízes. Assim, decidiu-se instalar um experimento exclusivo para a variedade SP80-3280, no qual fosse possível melhorar o manejo e o conhecimento das características contrastantes de crescimento que já tinham sido observadas no ensaio preliminar e que aparentemente se mantinham nos resultados do experimento 1.

Como parte das atividades deste primeiro experimento, foram realizadas duas leituras dos indicadores de fotossíntese, uma aos 23º e outra aos 31º dias após o estabelecimento do experimento em hidroponia. Somente a variedade RB83-5089 apresentou resultados significativos (p<0,05) nas medições da: Taxa de assimilação fotossintética (p-valor 0,058 e p-valor = 0,0035 em doses baixas e altas, respectivamente); Condutância estomática (p-valor = 0,0393 e p-valor = 0,0075 para doses baixas e altas respetivamente) e Taxa de transpiração (p-valor = 0,0307 e p-valor = 0,0129 para doses baixas e altas, respetivamente).

Já com a definição das variáveis que responderam significativamente às leituras de fotossíntese, foram feitas as comparações das médias, entre as datas (leituras feitas aos 23º e 31º dia sob as dosagens de nitrato) para estabelecer em quais datas as doses apresentaram diferenças dentro e entre as variedades e, se for o caso, entre as datas (tabelas 11, 12, 13, 14, 15 e 16). A fotossíntese nas doses baixas apresentou diferenças entre variedades na leitura no 23º dia para as doses 0,25 e 0,5 mM, o que se manteve só na dose 0,25 mM na leitura do 31º dia, para a variedade SP80-3280. Na variedade RB83-5089 as médias dos valores da taxa de assimilação fotossintética não diferiram significativamente para nenhuma das doses nas duas datas de leitura (tabela 11).

Tabela 11 - Comparação das médias da variável Taxa de assimilação fotossintética (A) das leituras feitas aos 23° e 31° dias, as duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato

l axa de assi		Taxa de assimilação fotossintética (A) 31° dia					
SP80-3280		RB83-5089		SP80-3280		RB83-5089	
8.9275	а	14.2915	а	8.1414	а	12.9253	а
8.0702	а	11.1975	а	9.2551	а	12.2212	а
9.1473	b	15.9165	а	9.1355	b	20.4274	а
8.3269	b	20.1775	а	13.9110	а	18.3735	а
10.1334	а	14.6053	а	11.7192	а	17.7841	а
	\$P80-3280 8.9275 8.0702 9.1473 8.3269	8.9275 a 8.0702 a 9.1473 b 8.3269 b	23° dia  SP80-3280 RB83-5089  8.9275 a 14.2915  8.0702 a 11.1975  9.1473 b 15.9165  8.3269 b 20.1775	SP80-3280       RB83-5089         8.9275       a       14.2915       a         8.0702       a       11.1975       a         9.1473       b       15.9165       a         8.3269       b       20.1775       a	23° dia  SP80-3280 RB83-5089 SP80-3280  8.9275 a 14.2915 a 8.1414  8.0702 a 11.1975 a 9.2551  9.1473 b 15.9165 a 9.1355  8.3269 b 20.1775 a 13.9110	23° dia 31° d SP80-3280 RB83-5089 SP80-3280  8.9275 a 14.2915 a 8.1414 a 8.0702 a 11.1975 a 9.2551 a 9.1473 b 15.9165 a 9.1355 b 8.3269 b 20.1775 a 13.9110 a	23° dia         31° dia           SP80-3280         RB83-5089         SP80-3280         RB83-5089           8.9275         a         14.2915         a         8.1414         a         12.9253           8.0702         a         11.1975         a         9.2551         a         12.2212           9.1473         b         15.9165         a         9.1355         b         20.4274           8.3269         b         20.1775         a         13.9110         a         18.3735

CV% = 33.47

CV% = 34.38

Fator variedade \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

Por outro lado, no caso das doses altas de nitrato na avaliação de Taxa de assimilação fotossintética nas doses altas apresentou diferenças entre variedades na leitura dos 23° dia para as doses 5,0 e 10,0 mM, o que na leitura dos 31° dia mudou e mostrou diferenças entre variedades em todas as doses. A variedade RB83-5089 manteve a tendência de não apresentar diferenças significativas nas médias dos valores da taxa de assimilação fotossintética para nenhuma das doses nas duas datas de leitura (tabela 12).

Tabela 12 - Comparação das médias da variável taxa de assimilação fotossintética (A) das leituras feitas aos 23° e 31° dias, as duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato

Doses	Taxa de assi	o fotossintétic dia	Taxa de assimilação fotossintética (A) 31 ° dia					
	SP80-3280	RB83-5089		SP80-3280	RB83-5089			
1,0 mM	16.1394	а	18.5270	а	10.9154	b	26.4748	а
1,5 mM	15.4236	а	21.0285	а	17.3375	b	27.1673	а
5,0 mM	20.7048	b	37.6573	а	18.4515	b	29.8478	а
10,0 mM	16.2447	b	34.5685	а	17.8711	b	29.3535	а
15,0 mM	20.5767	а	27.1997	а	17.9715	b	29.6595	а

CV% = 33.04

CV% = 28.14

Fator variedade \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

A comparação das medias das leituras da condutância estomática (Gs) nas doses baixas, apresentou diferenças entre variedades na leitura do 23° dia, para a dose 0,5 mM e na dose 0,25 mM na seguinte data de leitura (31°. Dia) (tabela 13).

Tabela 13 - Comparação das médias da variável Condutância estomática (Gs) das leituras feitas aos 23° e 31° dias, as duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato

Doses	Condutâ	stomática (Gs) dia	Condutância estomática (Gs) 31° dia					
	SP80-3280		RB83-5089		SP80-3280		RB83-5089	
0,0 mM	0.0768	а	0.1041	а	0.0600	а	0.0743	а
0,075 mM	0.0610	а	0.1020	а	0.0517	а	0.0812	а
0,25 mM	0.0796	а	0.1152	а	0.0784	b	0.1387	а
0,5 mM	0.0518	b	0.1446	а	0.0976	а	0.1223	а
0,75 mM	0.0729	а	0.0923	а	0.0736	а	0.0923	а

CV% = 39.92

Fator variedade \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

CV% = 39.30

Para a comparação das médias das leituras da condutância estomática (Gs) nas doses altas, foi mantido o padrão observado na Taxa de assimilação fotossintética (A), com diferenças entre variedades na leitura do 23° dia para as doses 5,0 e 10,0 mM, já na leitura do 31° dia apresentaram diferenças entre variedades em todas as doses avaliadas. A variedade RB83-5089 não apresentou diferenças em nenhuma das duas datas de leituras (tabela 14).

Tabela 14 - Comparação das médias da variável Condutância estomática (Gs) das leituras feitas aos 23° e 31° dias, as duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato

	Condu	stomática (Gs)	Condutância estomática (Gs)							
Doses	23° dia				31° dia					
	SP80-3280		RB83-5089		SP80-3280		RB83-5089			
1,0 mM	0.1006	а	0.1176	а	0.0684	b	0.1714	а		
1,5 m <b>M</b>	0.0882	а	0.1516	а	0.1059	b	0.1865	а		
5,0 mM	0.1280	b	0.2823	а	0.1126	b	0.2096	а		
10,0 mM	0.1108	b	0.2532	а	0.1150	b	0.2012	а		
15,0 mM	0.1294	а	0.1737	а	0.1063	b	0.2048	а		

CV% = 45.09

CV% = 28.84 / Int. F1xF2 (.01 =

Fator variedade \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

Quando se compararam as duas datas de leitura na taxa de transpiração (E) para as doses baixas, foi feita a conferência da consistência que mantem com os valores das leituras de condutância estomática e até sua aproximação aos valores das leituras de taxa de assimilação fotossintética nas doses baixas, só se diferenciando esta ultima na dose 0,5 mM relação às outras duas variáveis (tabela 15).

Tabela 15 - Comparação das médias da variável Taxa de transpiração (E) das leituras feitas aos 23° e 31° dias, as duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato

Doses	Taxa de transpiração (E) 23° dia				Taxa de transpiração (E) 31° dia						
	SP80-3280		RB83-5089		SP80-3280	RB83-5089					
0,0 mM	1.8408	а	2.6566	а	1.5925	а	1.7911	а			
0,075 mM	1.6453	а	2.5256	а	1.3033	а	1.9642	а			
0,25 mM	2.1017	а	2.8618	а	1.9883	b	3.3176	а			
0,5 mM	1.3998	b	3.4797	а	2.4008	а	2.9309	а			
0,75 mM	1.9297	а	2.4686	а	1.8398	а	2.2674	а			

CV% = 29.60

CV% = 37.68 Fator variedade \*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < .01)

Na comparação, as médias da taxa de transpiração (E), seguiram se mantendo as tendências já observadas na taxa de assimilação fotossintética (A), onde as diferenças entre variedades foram nas doses 5,0 e a 10,0 mM na leitura do 23° dia, e para a leitura do 31° dia as variedades se diferenciam em todas as doses (tabela 16).

Tabela 16 - Comparação das médias da variável Taxa de transpiração (E) das leituras feitas aos 23° e 31° dias, as duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato

Doses	Taxa		ispiração (E) dia	Taxa de transpiração (E) 31° dia						
	SP80-3280	RB83-5089			SP80-3280					
1,0 mM	2.4982	а	2.8501	а	1.6359	b	3.8697	а		
1,5 mM	2.2730	а	3.6193	а	2.4083	b	4.0250	а		
5,0 mM	3.0195	b	5.8900	а	2.5682	b	4.4050	а		
10,0 mM	2.6229	b	4.9576	а	2.5709	b	4.1291	а		
15,0 mM	2.8962	а	3.8244	а	2.3814	b	4.2944	а		

CV% =

CV% =29.10

Constatou-se que as duas variedades se comportaram do mesmo modo que para as atividades de nitrato redutase em folha e raiz para as duas faixa de doses, para as variáveis de resposta taxa de assimilação fotossintética (A), condutância estomática (Gs) e taxa de transpiração (E), na variedade SP80-3280 mantiveram diferenças de resposta para a variedade RB83-5089, nas condições do experimento 1, lembrando que algumas das tendências dos resultados na SP80-3280 já foram observadas no ensaio preliminar, onde não foram realizadas réplicas dos tratamentos, por isso, decidiu-se repetir o experimento aumentando-se o número de plantas, para observar o comportamento da avaliação da variedade SP80-3280. Nessa mesma linha, baseado nos padrões dos resultados da fotossíntese, considerou-se a ampliação do número de leituras e a consecutividade dentro do período de tratamento avaliado.

#### 4.2 Experimento 2.

O segundo experimento foi estabelecido a fim de determinar se o aumento do número de plantas por tratamento, somente na variedade SP80-3280, alteraria os resultados obtidos no experimento 1 para esta variedade, haja visto sua pouca sensibilidade para as doses baixas de nitrato e por ter os valores mais baixos nas variáveis de resposta aos indicadores de fotossíntese, quando comparada com a variedade RB83-5089, a qual mostrou maior capacidade de adaptação às doses baixas nas condições experimentais. Os critérios definidos no início deste trabalho tinham como finalidade a procura de variedades de cana-de-açúcar com comportamento contrastante nas condições experimentais estabelecidas, mas os resultados do experimento 1 deixaram dúvidas sobre a variedade SP80-3280, que exigiu obter resultados mais confiáveis sobre as tendências reais nas variáveis de resposta, frente aos tratamentos utilizados.

Uma vez coletado o experimento 2, as avaliações mostraram melhoria nos resultados, possivelmente pelo aumento no número de plantas analisadas, nas

faixas de doses, até mesmo na faixa de doses mais baixas das análises da atividades da enzima Nitrato redutase (Tabela 17), onde as atividades da nitrato redutase em folhas superaram os valores da atividade nas raízes e foram mais responsivas quando comparadas aos valores da atividade nas folhas e raízes no experimento 1. Observou-se que no tratamento controle, o resultado apresentou-se intermediário às doses 0,05 e 0,1 mM, fora dos parâmetros esperados. Possivelmente pelas reservas de nitrogênio advindas da planta fornecedora de gemas para o estabelecimento do experimento. Em geral, quando as doses foram aumentadas os padrões voltaram a seguir tendências crescentes e dependentes das doses.

Tabela 17 - Teste de Tukey para comparação das médias de atividade da Nitrato redutase em folhas e raízes (NIA\_F e NIA\_R) para os tratamentos com doses baixas, para o nível de confiança de 95%

Doses	Media NIA_F	(0,0248)	Doses	Media NIA_R	(0.00345 **)
0,1 mM	112,16	а	0,0 mM	21,055	а
0,0 mM	78,53	ab	0,1 mM	10,71	b
0,05 mM	70.88	b	0,05 mM	8,8575	b

Coeficiente de variação: 21 %

Coeficiente de variação: 28.4 %

Na tabela 18, são apresentadas as comparações das médias da atividade da nitrato redutase para doses altas em raízes, para um nível de significância de 95% pelo teste de Tukey. É evidente o aumento conseguido nos resultados na atividade da enzima nas raízes é evidente, também se destaca a queda da atividade na dose 25,0 mM.

Tabela 18 - Teste de TUKEY para comparação de médias da atividade Nitrato Redutase Assimilativa em raízes para as doses altas, variedade SP80-3280

Doses Altas	Media de atividade da nitrato redutase em raiz	p-valor (0,0193)
15,0	156,23	а
25,0	78,62	ab
2,5	39,96	b
5,0	33,79	b
1.0	27.97	b

Coeficiente de variação: 76,44 %

Seguindo os padrões clássicos das avaliações com doses nutricionais crescentes, foram feitas as análises de regressão para estabelecer as tendências

seguidas pela variedade nesta avaliação (figuras 7 e 8). Foram comparadas as duas atividades em raiz, encontrando-se que a situação de início (já comentada para os resultados da tabela 17) apresentou maior influência na atividade das raízes para as doses baixas, do que nas altas doses, onde apesar de apresentar uma  $r^2 = 0.34$  teve relação positiva, com valores da atividade da enzima que acompanharam os incrementos nas doses (figura 8).

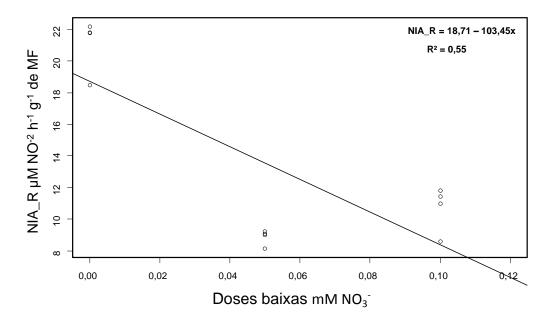


Figura 7 - Regressão da atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz na SP80-3280 em resposta a doses baixas de nitrato

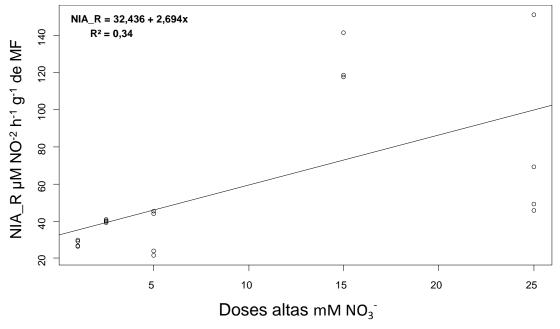


Figura 8 - Regressão para atividade da nitrato redutase assimilativa em raiz na SP80-3280 em resposta a doses baixas de nitrato

Para os fins originalmente propostos nesta avaliação, concluiu-se que o aumento no número de plantas, foi útil para aumentar a confiabilidade dos resultados das atividades da nitrato redutase nesta variedade principalmente para as doses baixas que foram as mais afetada no experimento 1.

A avaliação das doses de nitrato e sua interpretação mediante padrões como a atividade da enzima nitrato redutase, inicia com a consideração de que o nitrato é uma das principais fontes de nitrogênio nos solos agrícolas (GALLARDO; CÁNOVAS, 2002). Dada a natureza química do nitrato seu aproveitamento pela planta envolve a participação de vários transportadores e enzimas.

No experimento 1, as duas variedades obtiveram valores baixos na atividade da nitrato redutase tanto em raiz como em folhas, mais a RB83-5089 teve resultados significativos nas duas faixas de doses nas variáveis indicadoras de fotossíntese (tabelas da 11 a 16), o que não foi alcançado em nenhuma das duas faixas, pela SP80-3280.

Vários autores (MASCLAUX-DAUBRESSE; CHARDON, 2011; GUOHUA, et al., 2012), assinalam que no uso eficiente do nitrogênio (UEN), os passos metabólicos limitantes são diferentes em função das doses, nas doses altas a UEN é ligado à absorção do nitrato e nas doses baixas a UEN é determinada pelas mudanças na eficiência de remobilização do nitrogênio (ERN).

As diferenças nas atividades da nitrato redutase entre folha e raiz, é considerada dependente do genótipo, apresentando em algumas espécies, limitações de atividade da enzima nas folhas, que tem sido atribuída à entrada do nitrato no xilema na hora do transporte (CRUZ et al., 1993).

Outros autores atribuem as diferenças ao estado interno do nitrogênio e as mudanças no metabolismo do nitrato em quanto à distribuição dos fotoassimilados e a aclimatação fotossintética (XU et al., 2012).

A diferença nas respostas das variedades frente às duas faixas de doses parece estar relacionada com o comportamento dos transportadores e a cinética diferencial da nitrato redutase. Por outro lado, desde o ensaio preliminar até o experimento 2 a variedade SP80-3280 parece confirmar a sua condição (de exigente em nitrogênio), comportando-se como a mais responsiva das duas variedades, pela sensibilidade frente às doses baixas, limitantes pela concentração de nitrato, por exemplo na tabela 6, com uma atividade de 6,0 µM de NO<sub>2</sub> no controle (0,0 mM de

 $NO_3$ ), uma atividade de 11,51  $\mu$ M de  $NO_2$  em uma alta concentração de nitrato (a dose 30,0 mM de  $NO_3$ ), devido ao efeito inibitório na enzima nitrato redutase.

Por outro lado, a RB83-5089 demostrou tolerância, na medida em que obteve valores de  $r^2$  mais significativos, por exemplo na figura 3 a atividade da nitrato redutase em folhas nas doses altas com  $r^2$  = 0,21; na figura 4, a atividade da nitrato redutase em raízes nas doses altas com  $r^2$  = 0,76, ou na mesma atividade, porém nas doses baixas no caso da figura 5 com  $r^2$  = 0,29, sempre apresentando menor dispersão dos pontos no gráfico de atividade da nitrato redutase e, sem apresentar diferenças significativas nas doses altas em todas as avaliações de fotossíntese.

#### 4.3 Experimento 3

O comportamento das variedades em geral manteve as tendências descritas nos experimentos 1 e 2. Principalmente em relação ao tamanho da planta, dado que visualmente, a variedade RB83-5089 sempre apresentou maior altura (figura 9), do que a variedade SP80-3280, nesta ultima se manteve-se a característica de iniciar o perfilhamento mais cedo, até 10 dias antes do que na variedade RB83-5089.

Com os resultados de atividade da enzima nitrato redutase assimilativa (NIA), feita nas folhas e nas raízes, nas duas faixas de doses foi aplicado o teste de Tukey para a comparação das médias ao nível de 5% de probabilidade. Para as doses baixas (tabela 19), nos primeiros 2 tratamentos (0,0 mM "controle" e 0,05 mM) não houve diferenças significativas entre as variedades, mais sim entre tratamentos, e o tratamento 0,1 mM apresentou o maior contraste entre variedades e entre tratamentos. No caso das doses baixas na atividade das raízes foi também o tratamento 0,1 mM o único que apresentou diferenças entre variedades.



Figura 9 - Comparação visual dos padrões da altura e morfologia das duas variedades submetidas à dose de 2,5 mM de nitrato, na solução nutritiva

Tabela 19 - Comparação das médias da atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, quando as duas variedades foram submetidas às doses baixas de nitrato

		Nitrato re	edutase folh	а	Nitrato redutase raízes				
	RB8	3-5089	SP8	0-3280	RB8	3-5089	SP8	0-3280	
0,0 mM	12,238	аА	27,026	аВ	27,409	аА	33,068	аА	
0,05 mM	16,232	aA	28,325	аВ	25,622	aA	38,404	aA	
0,1 mM	14,155	bA	47,703	aAB	24,815	bA	47,813	aA	
0,25 mM	17,087	bA	65,990	aA	24,858	aA	41,631	aA	
0,5 mM	24,115	bA	65,804	аА	17,366	bA	46,612	aA	

CV% = 51.83 CV% = 42.82

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si pelo teste de TUKEY (5%)

Nas análises das atividades da enzima nitrato redutase assimilativa (NIA), feita nas folhas e nas raízes para as doses altas, verifica-se o melhor desempenho

na dose 10,0 mM, apesar de não ter apresentado diferença significativa com a dose 15,0 mM nas duas variedades. Por outro lado, houve uma queda da atividade Nitrato redutase assimilativa nas folhas na dose 25,0 mM, para as duas variedades (tabela 20). Quando são analisadas as comparações de médias entre as variedades quanto à atividade da enzima nas raízes, a dose que mais se destaca é de 10,0 mM. Doses acima deste valor apresentaram queda dos valores de atividade nas duas variedades (tabela 20).

Tabela 20 - Comparação das médias da atividade da nitrato redutase assimilativa em folhas e raízes, quando as duas variedades foram submetidas às doses altas de nitrato

	N	itrato Red	dutase Folha		Nitrato Redutase Raízes					
	RB83-5089		SP80-3	3280	RB83-	5089	SP80-3	3280		
2,5 mM	96,087	аВ	23,61	аВ	36,437	аА	26,442	аВ		
5,0 mM	205,912	aAB	250,427	aA	37,065	bA	155,021	aA		
10,0 mM	273,029	aA	354,702	aA	49,376	bA	189,086	aA		
15,0 mM	264,548	aA	334,530	aA	33,587	aA	56,705	аВ		
25,0 mM	166,223	bAB	303,627	aA	26,325	bA	53,409	аВ		

CV% = 27.32 CV% = 72.00

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si /teste de TUKEY (5%)

Um dos aspectos característicos da cana-de-açúcar é a alta produção de matéria seca. Os resultados coletados permitiram fazer o cálculo do índice de massa, tanto de parte aérea quanto de raízes e as duas faixas de doses foram comparadas pelo teste de Tukey. Não houve diferenças significativas entre as duas variedades, nem entre tratamentos para o índice de massa de raízes, nas duas faixas de doses, o que pareceria não ser o caso, se fosse levado em conta o maior crescimento e volume vegetal aparente apresentado pela variedade RB83-5089 (figura 9). Os resultados dos efeitos das doses de nitrato, no conteúdo de água nos tecidos foram corrigidos utilizando a fórmula apresentada no item 3.11.1 de material e métodos. Ficou evidente que na faixa de doses baixas, só a RB83-5089 apresentou diferenças significativas no índice de massa da parte aérea para as doses 0,05 e 0,25 mM (tabela 21).

Tabela 21 - Comparação das médias para Índice de massa, quando as duas variedades foram submetidas às doses baixas de nitrato

	Índio	ce de ma	ssa parte aér	ea	Índice de massa raízes					
	RB83-	5089	SP80-	3280	RB83-	5089	SP80-	3280		
0,0 mM	5,2646	аА	5,3214	аА	5,4697	аА	5,5248	аА		
0,05 mM	5,2318	bA	5,3087	aA	5,4560	aA	5,5692	aA		
0,1 mM	5,2667	aA	5,3004	aA	5,4926	aA	5,5625	аА		
0,25 mM	5,2062	bA	5,2922	aA	5,4418	aA	5,4473	аА		
0,5 mM	5,2148	aA	5,2619	aA	5,4587	aA	5,4991	aA		

CV% = 0.76

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si pelo teste de TUKEY (5%)

A mesma tendência se apresentou para a variedade RB83-5089, mesmo em doses altas de nitrato, para o índice de massa da parte aérea, com diferenças entre variedades e entre doses no tratamento 2,5 mM e entre doses, somente nos tratamentos 5,0; 15,0 mM e a dose 25 mM, que apresentou diferenças dentro dos tratamentos em cada uma das variedades (tabela 22).

Tabela 22 - Comparação das médias para índice de massa, quando as duas variedades foram submetidas às doses altas de nitrato

	Índi	ce de mas	ssa parte aér	ea	Índ	lice de m	assa de raíze	S
	RB83-	-5089	SP80-	3280	RB83-	5089	SP80-	3280
2,5 mM	5,2543	bAB	5,2916	аА	5,4624	аА	5,4982	аА
5,0 mM	5,2684	aAB	5,2881	aA	5,4625	aA	5,4924	aA
10,0 mM	5,2833	aA	5,2791	aA	5,4580	aA	5,4372	aA
15,0 mM	5,2506	aAB	5,2764	aA	5,5167	aA	5,4966	aA
25,0 mM	5,2310	аВ	5,2241	аВ	5,4879	aA	5,4964	aA

CV% = 0.50 / Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si /Teste de TUKEY (5%)

Na avaliação das massas secas das folhas (parte aérea) e raízes (tabela 23) foi observado diferenças em relação aos padrões, quando se comparou as duas faixas de doses avaliadas. Nas doses baixas foram observados resultados em que a variedade RB83-5089 atingiu os maiores valores de massa seca, tanto da parte aérea como das raízes, até porque as duas variedades mantiveram tendências crescentes nos valores, só que sempre maiores no caso da RB83-5089, apesar que não eram diferenças significativas entre as variedades. Entretanto, a variedade SP80-3280 não apresentou diferenças entre tratamentos dentro da variedade e sim

diferenças entre variedades nos tratamentos 0,25 e 0,5 mM na massa seca das raízes.

Tabela 23 - Comparação das médias na massa seca, quando as duas variedades foram submetidas às doses baixas de nitrato

	as abscs	baixas ac	illiato							
	N	lassa seca	a parte aérea	1	_	Massa seca raízes				
	RB83-	-5089	SP80-	3280	RB83-	5089	SP80-	3280		
0,0 mM	2.5555	aAB	1.7923	аА	0.5488	aA	0.2251	аА		
0,05 mM	3.3963	aAB	2.2058	aA	0.7680	aA	0.4588	аА		
0,1 mM	2.4993	аВ	1.9773	aA	0.6245	aA	0.2270	aA		
0,25 mM	3.0935	aAB	2.2153	aA	0.8841	aA	0.3427	bA		
0,5 mM	4.2988	aA	3.3713	aA	0.9258	aA	0.4053	bA		
CV% = 31.9	95				CV%	= 53.73				

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si pelo teste de

**TUKEY (5%)** 

Em relação às doses altas, não houve diferenças nem entre variedades, nem entre as doses para as raízes. Por outro lado, na massa seca da parte aérea, só houve diferença entre variedades no tratamento 10,0 mM, com a tendência de apresentar valores maiores da massa seca na variedade RB83-5089 (tabela 24).

Tabela 24 - Comparação das médias na massa seca, quando as duas variedades foram submetidas às doses altas de nitrato

	as 00505 a	allas de III	แลเบ							
	M	assa sec	a parte aérea	l	Massa seca raízes					
	RB83-	5089	SP80-	3280	RB83-	5089	SP80-	3280		
2,5 mM	6.7355	аА	5.0423	аА	0.8353	aA	0.5767	аА		
5,0 mM	8.1923	aA	6.7865	aA	0.7985	aA	0.8423	аА		
10,0 mM	10.751	aA	7.3200	bA	1.0630	aA	1.0763	аА		
15,0 mM	6.6750	aA	6.5238	aA	0.6555	aA	0.9168	аА		
25,0 mM	8.7805	aA	6.3868	aA	1.1035	aA	1.0228	аА		
CV% = 28.2	22				CV%	= 50.45				

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si /Teste de **TUKEY (5%)** 

Para estabelecer uma relação entre os resultados apresentados com o principal processo fornecedor de energia na natureza, buscou-se vincular o nitrato, que possui função nutricional, além de funcionar como sinal na arquitetura das raízes, no crescimento do ápice e numa das vias de regulação da abertura dos estômatos, entre outras (WALCH-LIU et al., 2006). Tomou-se o cuidado de efetuar um número adequado de leituras dos indicadores de fotossíntese, o que permitisse a

aplicação de um modelo estatístico pertinente na avaliação dos resultados, e assim obter a maior informação possível, tal e como foi proposto nos objetivos do experimento 3.

Tendo à disposição o GLIMMIX (modelo linear generalizado misto), teve-se como avaliar os efeitos fixos "tratamento", "tempo" e "tempo por tratamento" nas variáveis de resposta, tendo como efeito aleatório as variedades. Foram feitas as comparações das medias da taxa de assimilação fotossintética (A), condutância estomática (Gs), razão da taxa de assimilação fotossintética/ condutância estomática (A/Gs), taxa de transpiração (E), índice de eficiência do uso da água na folha avaliada (A/E), concentração subestomática de CO<sub>2</sub> (Ci) e a razão concentração de CO<sub>2</sub> subestomática/pressão de CO<sub>2</sub> corrigido (Ci/Can), apresentados na tabela 25. Observou-se que a variedade RB83-5089 nas doses baixas apresenta significância nos resultados das leituras apenas nas variáveis: (E), (A/E), (Ci) e (Ci/Can). Na taxa de transpiração (E) destacou-se a dose 0,5 mM seguida pelas doses 0,1 e 0,25 mM, que por sua vez superaram as doses 0,05 e o controle 0,0 mM. Na comparação de médias relacionadas com o uso da água A/E, foi a dose 0,25 a que se destacou, seguida pelas doses 0,1; 0,5 e 0,05 mM, separadas novamente do controle 0,0 mM. Numa ordem inversa, as variáveis anteriores se apresentaram os resultados das variáveis Ci e Ci/Can, as duas tiveram a média do controle 0,0 mM, seguida pelas medias das doses 0,05; 0,25 e 0,1 mM, separadas da dose 0,5 mM. O que significa que as variáveis E e A/E responderam às doses maiores, enquanto as variáveis Ci e Ci/Can responderam ao controle, antes que das doses maiores, na faixa das doses baixas nesta variedade.

Tabela 25 - Diferenças entre as médias dos indicadores de fotossíntese da RB83-5089, submetida a baixas doses de nitrato, através do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer

A/Gs	Doses	Médias		Е	Doses	Médias		A/E	Doses	Médias	
	0,5 mM	201,65	Α		0,0	3,918	Α		0,25	8,702	Α
	0,1 mM	196,28	AB		0,5	3,454	AB		0,1	8,691	Α
	0,25 mM	191,35	AB		0,05	3,350	AB		0,5	8,500	AB
	0,05 mM	187,03	В		0,1	3,238	AB		0,05	8,103	AB
	0,0 mM	184,19	В		0,25	3,101	В		0,0	7,406	В

Ci	Doses	Médias		Ci/Can	Doses	Médias	
	0,0	59,813	Α		0,0	0,162	Α
	0,05	52,257	AB		0,05	0,145	Α
	0,25	45,437	AB		0,25	0,128	AB
	0,1	38,889	AB		0,1	0,108	AB
	0,5	29,600	В		0,5	0,083	В

Para a SP80-3280, as variáveis que tiveram significância nos resultados das leituras quando submetidas às doses baixas foram: A, A/Gs, c, Ci e Ci/Can. No caso da taxa de assimilação fotossintética A, a dose que se destacou foi a 0,5 mM, seguida pelo controle 0,0 mM e as doses 0,25 e 0,05 mM, separadas da dose 0,1 mM. Um padrão de doses próximo apresentaram as variáveis A/Gs, c. As respostas das leituras nas variáveis Ci e Ci/Can foram num sentido oposto ao apresentado por A/Gs e c. No caso de Ci e Ci/Can a dose que se destacou foi a 0,05 mM, seguida pelo controle 0,0 mM e as doses 0,25 e 0,1 mM, separadas da dose 0,5 mM. Resumindo, no caso da SP80-3280, quando foi submetida às doses baixas, as variáveis A, A/Gs e c responderam às doses altas, no entanto, as variáveis Ci e Ci/Can responderam à dose 0,05 mM neste caso a menor (tabela 26).

Tabela 26- Diferenças entre as médias dos indicadores de fotossíntese da SP80-3280, submetida a baixas doses de nitrato, através do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer

Α	Doses	Médias		A/Gs	Doses	Médias		С	Doses	Médias	
	0,5 mM	21,794	Α		0,5	183,32	Α		0,5	35,768	А
	0,0 mM	21,053	AB		0,25	176,21	AB		0,0	31,204	AB
	0,25 mM	19,929	AB		0,0	162,36	AB		0,25	30,905	AB
	0,05 mM	18,179	AB		0,1	162,01	AB		0,1	28,402	В
	0,1 mM	17,612	В		0,05	155,24	В		0,05	28,214	В

Ci	Doses	Médias		Ci/Can	Doses	Médias	_
	0,05	107,80	Α		0,05	0,290	Α
	0,1	92,444	AB		0,1	0,253	AB
	0,0	88,686	AB		0,0	0,242	AB
	0,25	70,732	AB		0,25	0,192	AB
	0,5	59,705	В		0,5	0,165	В

No caso das doses altas de nitrato para a variedade RB83-5089 não houve diferenças significativas nos efeitos das doses, nem mesmo na interação "Tratamento x Tempo" foi possível detectar diferenças significativas para a variedade RB83-5089, a qual se mostrou extremamente variável para todos os indicadores de fotossíntese aplicados.

O desempenho da variedade SP80-3280 foi contrastante na faixa das doses altas onde as variáveis compartiram padrões do modo seguinte: A/Gs semelhante ao A/E; A semelhante ao "c"; Ci semelhante ao Ci/Can e o Can num padrão algo diferenciado.

Na SP80-3280, quando submetida às doses altas, as variáveis A/Gs e A/E foram maiores na dose 25,0 mM, seguida pelo grupo das doses 15,0; 10,0 e 1,0 na primeira variável e pelas doses 10,0; 15,0 e 5,0 mM na segunda, separadas da dose 2,5 mM no caso da A/Gs e pelas doses 1,0 e 2,5 mM na A/E. Para o caso das variáveis A e c, a resposta destacada foi no primeiro lugar para as doses 10,0; 15,0 e 25,0 mM, seguida pelas doses 5,0 e 2,5 mM, separadas da dose 1,0 mM. A sequencia das medias no caso das variáveis Ci e Ci/Can foi idêntica entre elas, com a dose 2,5 mM, seguida da 1,0 mM, logo o grupo da 5,0; 10,0 e 15,0 mM, e separada a 25,0 mM. A variável Can exibiu o padrão mais contrastante com a dose 1,0 mM, seguida do grupo da 2,5; 5,0 e 25,0 mM, separadas das doses 15,0 e 10,0 mM (tabela 27).

É importante destacar que a maioria das variáveis diretamente envolvidas com fotossíntese, condutância e transpiração responderam na faixa das doses de maior concentração de nitrato, no entanto, aquelas relacionadas com a concentração de CO<sub>2</sub>, tanto na câmara como na cavidade subestomática mantiveram o padrão de resposta nas doses de menor concentração de nitrato. No caso da variedade SP80-3280, tem-se a impressão de que as altas doses afetam os processos de troca gasosa, no entanto, a perda de água (E) não apresentou diferença significativa e consequentemente envolvimento, pelo menos direto, mas poderia ser avaliado pela "razão A/E", a qual estabelece a eficiência da planta em moderar a perda de água, ao mesmo tempo em que é permitida a absorção suficiente de CO<sub>2</sub> para a fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Por outro lado, as mudanças na taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> refletem em mudanças, tanto na condutância estomática, quanto na fotossíntese. Desta forma, naqueles mecanismos onde o nitrato tem efeito nas mudanças, as doses recebidas

pela planta têm condição de alterar a composição nitrogenada da área foliar e das células especializadas que tem participação no processo de fotossíntese (C<sub>4</sub>) como um todo (GHANNOUM; EVANS; CAEMMERER, 2011).

Tabela 27 - Diferenças entre as médias para indicadores de fotossíntese da SP80-3280, submetida a doses altas, através do teste de comparações múltiplas de Tukey – Kramer

Α	Doses	Médias		A/Gs	Doses	Médias		A/E	Doses	Médias	
	10, mM	30,93	Α		25 mM	194,59	Α		25,0 mM	9,183	Α
	25 mM	30,85	Α		5,0 mM	194,38	Α		10,0 mM	8,936	AB
	15 mM	30,76	Α		15,0 mM	186,17	AB		15,0 mM	8,783	AB
	5 mM	30,38	AB		10,0 mM	184,28	AB		5,0 mM	8,564	AB
	2,5 mM	27,21	AB		1,0 mM	178,37	AB		1,0 mM	8,124	В
	1,0 mM	24,48	В		2,5 mM	169,42	В		2,5 mM	7,884	В

С	Doses	Médias		Can	Doses	Médias	
	10,0 mM	50,536	Α		1,0 mM	356,16	Α
	15,0 mM	50,214	Α		2,5 mM	348,21	AB
	25,0 mM	49,107	Α		5,0 mM	347,73	AB
	5,0 mM	47,482	AB		25,0 mM	345,66	AB
	2,5 mM	44,000	AB		15,0 mM	342,25	В
	1,0 mM	38,814	В		10,0 mM	339,59	В
Ci	Doses	Médias		Ci/Can	Doses	Médias	
	2,5 mM	66,929	Α		2,5 mM	0,192	А
	1,0 mM	57,821	AB		1,0 mM	0,161	AB
	5,0 mM	41,317	ВС		5,0 mM	0,118	ВС
	10,0 mM	37,911	ВС		10,0 mM	0,110	ВС
	15,0 mM	35,845	ВС		15,0 mM	0,104	ВС
	25,0 mM	28,207	С		25,0 mM	0,081	С

As análises feitas para as variáveis indicadoras de fotossíntese, entre outras, coincidem no fato de apresentarem grande variabilidade detectada pela análise das leituras repetidas. Ainda assim, foi possível interligar o comportamento das variedades submetidas às duas faixas de doses, por meio de padrões gráficos ajustados às sete datas de leituras, feitas durante o período de 35 dias, para as variáveis: taxa de assimilação fotossintética (A), condutância estomática (Gs) e taxa de transpiração (E). Assim a figura 10 descreve o acompanhamento da taxa de assimilação fotossintética (A), para as duas variedades na faixa das doses baixas.

Nos períodos sucessivos de cinco dias após o inicio da adição das doses, para a variedade RB83-5089, foi possível observar diferenças em relação à

variedade SP80-3280. Destaca-se a dose 0,1 mM, que foi a máxima no dia 14°, alcançando um valor maior do que 40 μmol CO<sub>2</sub>, por outro lado, a SP80-3280, não conseguiu superar 30 μmol CO<sub>2</sub>, em nenhuma das doses testadas durante as sete medições, no entanto, nas duas variedades, a tendência foi decrescente no resto das datas, ainda assim, a RB83-5089 apresentou as maiores taxas de assimilação fotossintética.

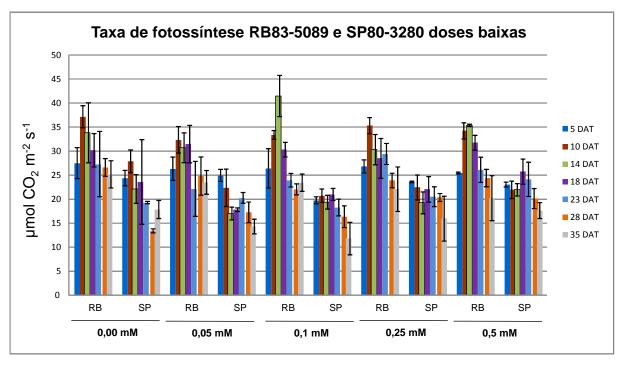


Figura 10 - Avaliações mediante leituras repetidas para a fotossíntese, nas variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP), submetidas a doses baixas, num período de 35 dias

Já no caso das doses altas, a variedade RB83-5089 só conseguiu superar o nível de 40 μmol CO<sub>2</sub> nas doses 15,0; 10,0 e 5,0 mM, desde entre o 10° e o 18° dia, entanto, no restante das datas, teve queda nos valores. Por outro lado, a SP80-3280 manteve uniformidade nas respostas de fotossíntese desde o 10° até o 28° dia, para as doses 10,0; 15,0 e 25,0 mM, no entanto, no 35° dia, conseguiu superar o nível de 40 μmol CO<sub>2</sub>, nas doses que vão de 5,0 até 25,0 mM (figura 11).

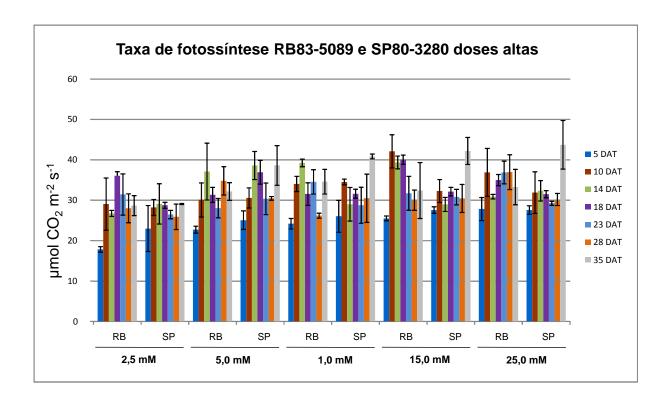


Figura 11 - Avaliações mediante leituras repetidas para a fotossíntese nas variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP) submetida a doses baixas num período de 35 dias

Acompanhando os padrões de resposta das variedades para as doses baixas (figura 12), ficou evidente que na comparação da condutância estomática para os controles, os níveis conseguidos pela RB83-5089 foram maiores a partir do 10° dia e que a SP80-3280 só conseguiu igualar ou superar o nível de 0,20 mol no 23° dia, nas doses 0,05 e 0,5 mM, entanto, a RB83-5089 igualou ou superou aquele nível desde o 10° até o 14° dia, nos tratamentos que incluem o controle e o restante das doses, ainda com tendência decrescente.

A condutância estomática nas doses altas (figura 13) apresentou o seguinte padrão: a RB83-5089 na dose 2,5 mM foi igual ou superior ao nível de 0,20 mol nos 10°, 18° e 23° dias, ainda assim com tendência decrescente. Na mesma dose, a SP80-3280 só conseguiu atingir no 10° e 14° dias e, também decresceu. Para a dose 5,0 mM, o padrão da RB83-5089 foi de igualar ou superar o nível de 0,20 mol nos 14° e 28° dias, ainda assim decresceu. A SP80-3280, nessa mesma dose igualou ou superou o nível 0,20 mol e então decresceu, logo no 35° dia, igualou ao nível 0,25 mol. Na dose 10,0 mM, a RB83-5089 igualou ou superou o nível 0,20 mol no 10° e 23° dias, no entanto, no 14° dia, igualou ao nível 0,25 mol, mas a tendência foi decrescente. Já a SP80-3280 na mesma dose, igualou ou superou o nível 0,20

mol nos 10° e 23° dias e no 35° dia superou o nível 0,25 mol, com tendência crescente. A RB83-5089 superou o nível 0,20 mol no 10°, 14° e 18° dias, quando submetida à dose 15,0 mM, mas tende a decrescer. SP80-3280 superou o mesmo nível, só nos 10° e 18° dias, mas no 35° dia, superou o nível 0,25 mol, com tendência crescente. O efeito da dose 25,0 mM nas duas variedades parece ser desfavorável já que a RB83-5089 somente no 10° dia, conseguiu superar o nível 0,20 mol, entanto que no18° e 35° dia, apenas conseguiu igualar a esse nível. Na SP80-3280, todas as datas tiveram queda em relação ao nível 0,20 mol e só conseguiu superar o nível 0,25 mol no 35° dia.

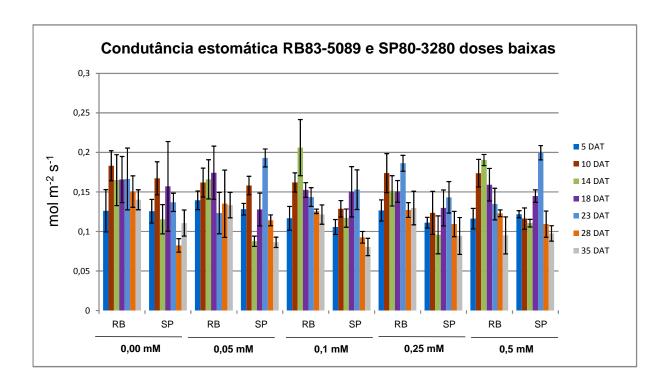


Figura 12 - Avaliações mediante leituras repetidas para a condutância estomática nas variedades RB83-5089 e SP80-3280, submetida a doses baixas num período de 35 dias

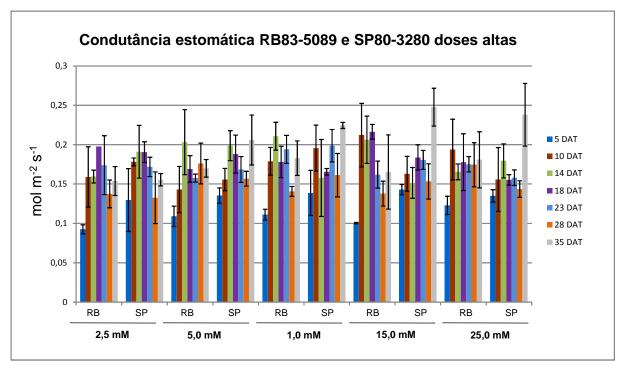


Figura 13 - Avaliações mediante leituras repetidas para a condutância estomática nas variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP), submetida a doses altas num período de 35 dias

Na observação dos resultados de transpiração que são apresentados na figura 14, ficou evidente que na comparação das médias de transpiração, o controle da RB83-5089 obteve médias que superaram o nível de 4,0 mol de H<sub>2</sub>O durante três datas (14°, 18° e 23°), e no 10° dia, cujo desvio padrão até superou o nível de 5,0 mol de H<sub>2</sub>O. Quando comparado, o padrão da SP80-3280 só consequiu superar o nível de 4,0 mol de H<sub>2</sub>O m s<sup>-1</sup> no 18° dia e, se aproximou do aquele nível, pelo desvio padrão no 10° dia. Na dose 0,05 mM, a RB83-5089 obteve médias que superaram as da SP80-3280 desde o 5° data até a 18° dia. Na dose 0,1 mM aconteceu que as médias de transpiração da RB83-5089 superaram todas as médias da SP80-3280 nas sete datas avaliadas, o mesmo que aconteceu na dose 0,25 mM. Do mesmo modo, na dose 0,5 mM, as médias da RB83-5089 superaram os valores das médias da SP80-3280 em seis das datas avaliadas A exceção foi no 23° dia, a qual superou o nível de 4,0 mol de H<sub>2</sub>O. É interessante destacar pelos resultados da taxa de transpiração, que nas duas variedades a taxa de transpiração foi se ajustando no decorrer dos 35 dias no sentido da diminuição, em resposta à faixa de doses baixas.

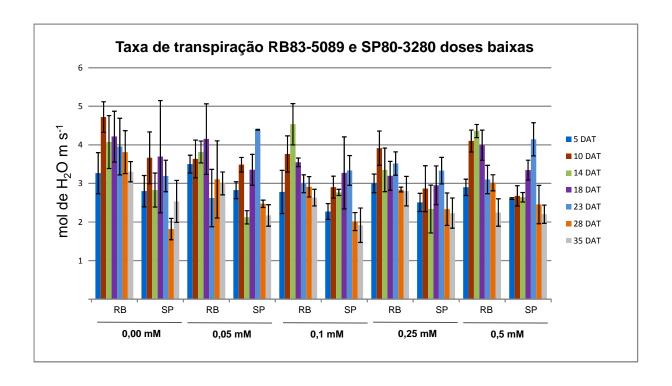


Figura 14 - Avaliações mediante leituras repetidas para a taxa de transpiração nas variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP) submetida a doses baixas num período de 35 dias

Quando são comparadas as duas variedades, no caso das doses altas, ficou claro, que não se apresento um padrão único, onde uma delas obtivesse para todas as doses em todas as datas, o maior nível das médias de transpiração. Assim no caso da dose 2,5 mM, só no 28° dia, a RB83-5089 obteve uma média de transpiração de 3,0 mol de H<sub>2</sub>O, que foi o valor da média da SP80-3280 para a mesma data. O mesmo aconteceu na dose 5,0 mM. Já na dose 10,0 mM, a variedade RB83-5089 e superou a SP80-3280 nos 14°, 18°, 23° e 28° dias. Além disso, no caso da dose 15,0 mM, três das médias obtidas pela variedade RB83-5089 (10°, 14° e 18° dias), não somente excederam o nível das médias obtidas nas mesmas datas pela SP80-3280, mas por sua vez, conseguiram atingir os maiores valores das médias para todas as doses (acima de 5,0 mol de H<sub>2</sub>O). Finalmente, a dose 25,0 mM, apresentou um padrão das médias onde as variedades se alternaram nos níveis que alcançaram, até que na ultima data, a SP80-3280º apresentou uma taxa de transpiração acima de 4,0 mol de H<sub>2</sub>O enquanto a RB83-5089 ficou apenas acima de 3,0 mol de H<sub>2</sub>O (figura 15).

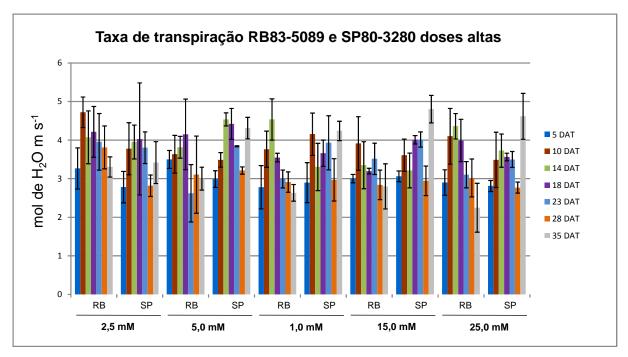


Figura 15 - Avaliações mediante leituras repetidas da taxa de transpiração nas variedades RB83-5089 (RB) e SP80-3280 (SP), submetidas a doses altas num período de 35 dias

Nas figuras 16 e 17 pode-se observar que as plantas das variedades SP80-3280 e RB83-5089, que receberam os tratamentos de 10,0, 15,0 e 25,0 mM de nitrato. Elas mesmas foram colocadas juntas, com a finalidade de comparar a morfologia adquirida por as plantas de ambas variedades, quando submetidas às doses altas de nitrato, e, simultaneamente, poder relacionar os efeitos causados pelas maiores concentrações de nitrato, dentro da mesma variedade. As imagens permitem apenas, uma aproximação aos resultados das mudanças sofridas na arquitetura foliar, uma vez que só o contraste das variáveis bioquímicas e fisiológicas conseguiu aclarar a significância de algumas das variações na morfologia, cor, crescimento, perfilhamento e outros, que foram provocadas pelos efeitos das doses altas de nitrato, como são descritos adiante, no caso da cor, pelas variáveis de resposta conteúdo de clorofilas e razão das clorofilas.



Figura 16 - Coleta das plantas da variedade SP80-3280, submetidas às doses altas de nitrato, no final do experimento 3



Figura 17 - Coleta das plantas da variedade RB83-5089, submetidas às doses altas de nitrato, a foto apresenta os vasos que receberam as doses 10,0; 15,0 e 25 mM, no experimento 3

Acompanhando os padrões de resposta no restante das variáveis, foi avaliado o conteúdo das clorofilas "a", "b" e a razão "a/b". O resultado do teste de Tukey para

as doses baixas estabeleceu que a variedade RB83-5089 foi a que teve maior acumulo de clorofila "a". No mesmo teste, não foi possível estabelecer uma relação direta entre o conteúdo e as doses aplicadas, dado que não houve diferenças significativas entre os tratamentos (tabela 28). Para as doses altas, no conteúdo de clorofila "a", com a exceção da dose 10,0 mM, o restante das doses não apresentou diferenças significativas entre variedades, mas, por outro lado, houve diferenças entre as doses 5,0; 10,0 e 15,0 mM dentro das variedades (tabela 29).

Tabela 28 - Comparação das médias da variável conteúdo em g L<sup>-1</sup> de Clorofila "a" das duas variedades, submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato

	Conteúdo de (	Clorofila "a" g L <sup>-1</sup>	Conteúdo de Clorofila "a" g L <sup>-1</sup> <b>SP80-3280</b>		
	RB8	3-5089			
0,0 mM	0,0698	aAB	0.0488	bAB	
0,05 mM	0,0680	аВ	0.0452	bB	
0,1 mM	0,0801	aAB	0,0527	bAB	
0,25 mM	0,0826	aAB	0,0507	bAB	
0,5 mM	0,0847	aA	0,0646	bA	

CV% = 12,29 / Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si /Teste de TUKEY (5%)

Tabela 29 - Comparação das médias da variável conteúdo em g L<sup>-1</sup> de Clorofila "a" das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas doses de nitrato

	Conteúdo de Cl	Conteúdo de Clorofila "a" g L			
	RB83-	5089	SP80-3280		
2,5 mM	0,0779	aC	0,0678	aC	
5,0 mM	0,0859	aBC	0,0850	aAB	
10,0 mM	0,0992	aAB	0,0807	bBC	
15,0 mM	0,0899	aBC	0,0911	aAB	
25,0 mM	0,1068	aA	0,0973	aA	

CV% = 8,57 / Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si / Teste de TUKEY (5%)

Para o caso da clorofila "b", as diferenças foram significativas, tanto nas doses baixas como altas e, também, nas duas variedades em três dos cinco tratamentos, mantendo-se sem variações no último tratamento (0,5 mM). Novamente a variedade RB83-5089 apresenta o maior conteúdo relativo e, com a mesma tendência de aumento, acompanhando o incremento das concentrações das doses aplicadas (tabela 30). Nos resultados avaliados nas doses altas, manteve-se a tendência observada nos tratamentos anteriores, com os conteúdos crescendo à

medida que as doses vão crescendo, nele também se evidenciou, que o conteúdo de clorofila "b" foi maior na variedade RB83-5089 em quatro dos tratamentos e no controle, com diferenças significativas em relação à SP80-3280. Já dentro das variedades (RB83-5089 e SP80-3280 respectivamente), as diferenças foram entre os tratamentos 0,05 e 0,5 mM.

Tabela 30 - Comparação das médias da variável conteúdo em g L-1 de Clorofila "b" das duas variedades, submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato

	Conteúdo de Cl	orofila "b" g L <sup>-1</sup>	Conteúdo de Clorofila "b" g L <sup>-1</sup>		
	RB83-	5089	SP80-	-3280	
0,0 mM	0.0307	aAB	0.0198	bAB	
0,05 mM	0.0291	аВ	0.0156	bB	
0,1 mM	0.0345	aAB	0.0195	bAB	
0,25 mM	0.0352	aAB	0.0170	bAB	
0,5 mM	0.0363	aA	0.0229	bA	

CV% = 12.93

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si pelo teste de TUKEY (5%)

Quando foram submetidas às doses altas de nitrato o conteúdo de clorofila "b" nas variedades mostrou diferenças significativas entre elas em quatro das cinco doses, com a exceção da dose 2,5 mM. Nessa mesma dose houve diferenças de tratamento dentro e entre variedades, como no caso do tratamento 25,0 mM (tabela 31).

Tabela 31 - Comparação das médias da variável conteúdo de Clorofila "b" em g L<sup>-1</sup> para as duas variedades, submetidas aos tratamentos com doses altas doses de nitrato

-	Conteúdo de C		Conteúdo de Clorofila "b" g L <sup>-1</sup> SP80-3280		
	RB83	-5089			
2,5 mM	0.0301	аВ	0.0381	аА	
5,0 mM	0.0334	aAB	0.0224	bB	
10,0 mM	0.0404	aAB	0.0156	bB	
15,0 mM	0.0368	aAB	0.0211	bB	
25,0 mM	0.0445	aA	0.0137	bB	

CV% = 22,96

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si pelo teste de TUKEY (5%)

A avaliação seguinte foi a razão das clorofilas "a/b", na faixa das baixas concentrações de nitrato, o maior valor da razão em todos os tratamentos se deu na SP80-3280, apresentando diferenças significativas entre as variedades. Entretanto, a variedade SP80-3280 apresentou diferenças significativas dos tratamentos dentro

da variedade, contrário ao que aconteceu com a RB83-5089, que nas doses baixas não apresentou diferenças nos tratamentos dentro da variedade e somente na dose 0,25 mM não apresentou diferenças (tabela 32).

Tabela 32 - Comparação das médias da razão das Clorofilas "a/b"; das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses baixas de nitrato

	Razão das Clo	Razão das Clorofilas "a/b"			
	RB83-		SP80-3280		
0,0 mM	2.2726	bA	2.4545	aC	
0,05 mM	2.3396	bA	2.9256	aAB	
0,1 mM	2.3262	bA	2.7327	аВ	
0,25 mM	2.3422	bA	2.9771	aA	
0,5 mM	2.3343	bA	2.8176	aAB	

CV% = 4.54

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem si pelo teste de TUKEY (5%)

A situação mais critica se apresentou na avaliação das doses altas, onde a RB83-5089 seguiu se manifestando como altamente adaptada e por outro lado a SP80-3280, quando exposta a altas doses, respondeu com valores extremos, como aqueles que, segundo a literatura, seriam apresentados por uma planta esciófila (LICHTENTHALER, 1987), talvez esta seja uma mudança das mais extremas provocadas pelo nitrato nessa variedade dentro das avaliações realizadas (tabela 33).

Tabela 33 - Comparação das médias da razão das Clorofilas "a/b" das duas variedades submetidas aos tratamentos com doses altas de nitrato

	Razão das Cl	orofilas "a/b"	a/b" Razão das Clorofilas "a/b" <b>SP80-3280</b>		
	RB83-	5089			
2,5 mM	2.5873	аА	1.7908	аВ	
5,0 mM	2.5718	bA	4.9880	aAB	
10,0 mM	2.4556	bA	6.6013	aA	
15,0 mM	2.4454	bA	5.7720	aA	
25,0 mM	2.4059	bA	7.2696	aA	

CV% = 40,22

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula para variedades e maiúscula para níveis de N, não diferem entre si pelo teste de TUKEY (5%)

As diferenças notáveis nos resultados das variedades em relação às variáveis de resposta ligadas à clorofila necessitaram uma análise mais profunda, levando-se

em conta o papel da clorofila no processo da fotossíntese e o nível de respostas que conseguiu se associar ao nitrato nas duas faixas de doses, o que já tinha sido visto nas análises de regressão simples (avaliado pelo coeficiente de determinação r²) entre as doses de nitrato e as 18 variáveis de resposta avaliadas no final do experimento 3 (tabela 34). Naqueles resultados, destacam-se os valores de r² de 0,71; 0,72 e 0,73 para o conteúdo de clorofila "a", clorofila "b" e clorofila total da RB83-5089, por outro lado os valores de r² de 0,44 e 0,48 para o conteúdo de clorofila "a" e clorofila "b" da SP80-3280. Foi o que assinalou uma relação causal entre as doses altas de nitrato e as variáveis da clorofila, e que poderia ser útil para explicar o comportamento das variedades.

Tabela 34 - Análise de regressão linear simples com o nitrato como fator e 18 variáveis de resposta, avaliando as duas faixas de doses nas variedades RB 83-5089 e SP80-3280, no experimento 3

	охроннони	baixas		Doses altas				
	RB83-5089		SP80-	3280	RB83-	5089	SP80-	3280
Variável	p-valor	r²	p-valor	r <sup>2</sup>	p-valor	r²	p-valor	r <sup>2</sup>
А	0,048	0,16	(0,062)	-	0,0139	0,24	0,0018	0,46
Gs	0,0049	0,33	-	-	0,0101	0,21	0,0032	0,47
A/Gs	0,0075	0,3	-	-	()		0,0024	0,32
Е	0,0163	0,16	-	-	0,0467	0,13	0,0096	0,35
A/E	0.0184	0.23	()	()	()	()	()	()
С	0,044	0,2	0,0249	0,21	0,0133	0,21	0,0082	0,53
Can	(0.966)	-	-	-	0,0337	0,39	0,0084	0,53
Ci	0,0297	0,2	-	-	-	-	0,0479	0,53
Ci/Can	0,0296	0,19	-	-	-	-		0,34
NIA_F	0,0154	0,25	0,0346	0,39	0,0071	0,37	0,0013	0,77
NIA_R	(0.562)	-	-	-	0,0336	0,24	0,0125	0,34
MS_F	0,0359	0,21	0,00037	0,49	0,0021	0,46	-	-
MS_R	0.0358	-	-	-	-	-	-	-
MS_R/MS_F	-	-	-	-	0,0078	0,36	-	-
MS Total	0,0361	0,18	0,0041	0,34	0,00496	0,39	-	-
Chl_a	0,0089	0,29	0,00129	0,42	0,00943	0,71	0,0235	0,44
Chl_b	0,0478	0,16	-	-	0,0187	0,72	0,0403	0,48
Chl_Total	0,0094	0,28	0,01745	0,24	0,0053	0,73	-	-
Chl_a/Chl_b								

Quando se avaliaram as respectivas regressões para a faixa das doses baixas, houve só três casos de regressões significativas para a SP80-3280, a qual

obteve significância na regressão entre conteúdo de clorofila "a" e as variáveis massa seca da parte aérea e o índice de massa da parte aérea, com  $r^2$  = 0,18 e 0,20 respetivamente. E a estabelecida entre o conteúdo de clorofila "total" e o índice de massa da parte aérea, com  $r^2$  = 0,25. Do outro lado, a variedade RB83-5089 estabeleceu só uma associação de regressão significativa com o diferencial de concentração de  $CO_2$  na câmara "c" e obteve um  $r^2$  = 0,21. Os resultados das duas variedades para a faixa das doses altas são apresentados na tabela 35. Dos resultados, o primeiro que chamou a atenção foi para a variedade SP80-3280, na associação entre o conteúdo de clorofila "total" e as 16 variáveis, onde não houve significância com nenhuma variável. No caso da RB83-5089, naquela mesma interação obteve associações significativas com 8 das variáveis, todas contrastantes em relação a SP80-3280, como exemplo as variáveis: A e Gs, pela relação direita com a fotossíntese, além dos valores do  $r^2$  no caso de duas variáveis relacionadas com o conteúdo de  $CO_2$  na câmara do aparelho IRGA, como são "c" e Can que obtiveram  $r^2$  de 0,39 e 0,38 respetivamente.

Outras das interações interessantes, foram as das atividades da nitrato redutase na raiz, que estiveram presentes na clorofila total e na razão das clorofilas, com r² de 0,13 e 0,18 respetivamente, o que reflete que pelo menos uma das clorofilas fez a contribuição, no caso da RB83-5089, algo que não aconteceu com a SP80-3280. E também fala de adaptação por um lado e de diferença no transporte, quando se junta com a atividades da nitrato redutase na folha (no caso da SP80-3280 houve significância, com a exceção da clorofila total, o que representa uma consequência de conseguir a proporção mais adequadas ou normais para as condições de crescimento) e logo nas associações com a massa da parte aérea, massa total e a razão das massas nas duas variedades, parece descrever e definir dois caminhos para conseguir se adaptar às altas doses, nas condições de crescimento adotadas e conseguir o acumulo de biomassa.

Outro contraste, foi aquele que vem da comparação entre as associações das (16) variáveis e a razão das clorofilas "a/b", já que a mesma foi mais informativa na variedade SP80-3280, do que na RB83-5089, que só teve cinco regressões significativas, frente às nove da SP80-3280, entre elas, destaca-se o contraste entre a razão das massas, não significativa em SP80-3280 e praticamente significativa em todas as variáveis da RB83-5089.

Por outro lado, a variável massa total, que foi significativa nas duas variedades, no entanto, na RB83-5089 não foi significativa na razão das clorofilas, entanto que na SP80-3280 não foi significativa no conteúdo de clorofila total, então, ficou evidente que, as altas doses foram refletidas nas proporções das clorofilas "a" e "b" nas quantidades que individualmente fazem logo, o acumulo ótimo para o funcionamento metabólico normal, nas condições de crescimento que as plantas das duas variedades foram colocadas (tabela 35).

Tabela 35 - Análise de regressão linear simples com as quatro variáveis de clorofila como fator, frente às 16 variáveis de resposta, avaliadas na faixa das doses altas nas variedades RB83-5089 e SP80-3280, no experimento 3

		RB83		SP80	-3280			
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Razão a/b	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Razão a/b
Variável	r <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>	r <sup>2</sup>
А	0,17	0,23	0,18	(0,068)	0,31	0,38	(0,867)	0,40
Gs	0,19	0,26	0,21	(0,057)	0,31	0,39	(0,877)	0,39
A/Gs	(0,086)	0,14	(0,58)	(0,138)	(0,193)	0,15	(0,866)	(0,061)
Е	(0,117)	0,14	(0,099)	(0,197)	0,25	0,14	(0,300)	0,20
A/E	(0,388)	(0,715)	(0,419)	(0,447)	(0,088)	0,43	(0,099)	0,33
С	0,31	0,41	0,39	0,26	0,41	0,54	(0,986)	0,53
Can	0,35	0,34	0,38	0,27	0,15	0,57	(0,206)	0,45
Ci	(0,784)	(0,790)	(0,981)	(0,751)	(0,160)	(0,051)	(0,654)	(0,058)
Ci/Can	(0,511)	(0,493)	(0,664)	(0,934)	(0,228)	(0,108)	(0,755)	(0,107)
NIA_F	(0,595)	(0,261)	(0,511)	(0,277)	0,24	0,29	(0,781)	0,30
NIA_R	(0,052)	(0,084)	0,13	0,18	(0,890)	(0,284)	(0,327)	(0,552)
MS_F	0,22	0,16	0,25	0,16	0,21	0,23	(0,860)	0,16
MS_R	(0,542)	(0,757)	(0,514)	(0,974)	(0,062)	(0,118)	(0,496)	(0,175)
MS_R/MS_F	(0,0510)	0,17	0,15	0,28	(0,646)	(0,568)	(0,140)	(0,717)
MS Total	0,19	0,13	0,21	(0,053)	0,20	0,21	(0,786)	0,14
IMF	(0,542)	(0,834)	(0,614)	(0,172)	0,27	(0,061)	(0,387)	(0,091)

Nota: Números entre parêntesis representam o p-valor de significância

A principal função da Chl "b" é recolher a energia da luz, trabalhando em conjunto com a clorofila "a" e os carotenoides, para converter a energia da luz em energia química. No fotosistema, nome de um grande complexo proteína-pigmento, onde tem lugar a reação fotoquímica, em que um par especial de moléculas de clorofila "a" funciona como o chamado centro de reação normalmente acompanhado por mais de 200 moléculas de clorofila chamadas de "antena" (Chls) (TANAKA, et

al., 1998). A notável capacidade das plantas é que podem aumentar ou diminuir o tamanho da antena, em resposta às respectivas condições de luz ambientais. Sob condições de elevadas intensidades de luz, por exemplo, em um habitat de sol, as plantas têm menor tamanho de antena, ao contrário, quando sob condições de baixa luminosidade, num habitat sombreado, as plantas têm maior tamanho da antena (TANAKA, et al., 1998).

Nesse contexto, a aclimatação frente às mudanças na irradiação, envolvem uma óptima distribuição do nitrogênio na planta inteira, folhas e níveis celulares (HIROSE; WERGER, 1987; EVANS, 1989; HIKOSAKA; TERASHIMA, 1995). EVANS (1989, 1993) sugere que, nas folhas sombreadas, os cloroplastos devem aumentar a proporção de nitrogênio dedicado a proteínas dos tilacóides mais que em proteínas solúveis, a fim de equilibrar a captura e a transferência de energia.

A razão das clorofilas "a/b" pode ser um indicador de como é compartilhado o nitrogênio dentro da folha. Sob condições ótimas de nitrogênio, teria que se apresentar uma correlação positiva entre a proporção de núcleos do PSII e dos complexos coletores clorofila-proteínas (LHCII) (TERASHIMA; HIKOSAKA, 1995). É reconhecido que o LHCII contém a maior parte da clorofila "b", portanto, a razão entre o PSII e LHCII (razão das clorofilas "a/b") deve aumentar com a diminuição da disponibilidade de N. Daí a importância do fornecimento ótimo de luz, para o transporte e compartilhamento interno no nitrogênio.

Na procura bioinformática, para conseguir determinar os níveis de transcrição dos genes Nrt2, Nrt1 e outros, fez-se uma busca no NCBI (Uni-Gene), nas sequências tipo "ETS´s" do "Transcriptoma" da cana de açúcar e foi encontrado um grupo de sequências, cada uma identificada pelo item respectivo naquela base de dados, dos quais temos todas as sequências no formato "FASTA" e os seus códigos de acesso no "NCBI". A maior dificuldade na procura de sequências para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores, foi para o grupo dos genes Nrt2, principalmente entre NRT2.1 e NRT2.2, pela grande similaridade entre eles e pela escassez das sequências tipo "ETS´s" para cana-de-açúcar.

No caso do grupo Nrt1, não foi possível desenhar os oligonucleotídeos iniciadores para os "putative nitrate transporter NRT1.5 e NRT1.7 (O Nrt1.5 que presume se codifica para o transportador de nitrato chamado de NRT1-5 ou "Xylem loading, long distance transport in *Arabidopsis*"; e o Nrt1.7 que presume se atua na remobilização de NO<sub>3</sub> também na *Arabidopsis*) (OLIVEIRA, et al., 2009; FAN, et al.,

2009). No entanto, conseguiu-se desenhar oligonucleotídeos iniciadores para o Nrt1.8, que tem sido demonstrado atividade oposta ao gene Nrt1.5 na Arabidopsis, no processo de desintoxicação causada por o íon cádmio (LI, et al., 2010).

Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores da nitrato redutase assimilativas (NIA) [(NADH) EC:1.7.1.1 / (NADPH) EC:1.7.1.3], enzima responsável pela catalisação da redução do nitrato a nitrito. Aproveitou-se a grande similaridade existente entre a cana-de-açúcar e as espécies *Zea mayz* e *Sorghum bicolor*, na procura das sequências dos genes daquela família, para a síntese dos "primers".

Finalmente, o gene Gs2 da Glutamina sintetase, que tem atividade destacada na assimilação do nitrogênio nas distintas formas que a planta é capaz de aproveitar. Pela sua importância no relacionamento dos metabolismos do nitrogênio e o carbono (LIU, et al., 2008). As sequências obtidas para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) foram:

ScNTR1.1

>TC141846

F 5' CGGCAAATAGAGCACACAGA 3'/ R 5' CATATACAGCAGAAAACACT 3' Amplicon 191pb

ScNRT1.2

>TC129771

F 5' AATTCAGGTTCCTTGACAA 3'/ R 5' GACGCTGATGATGTCGAAGA 3' Amplicon 278pb

ScNRT1.8

>TC141846

F 5' GGCAGGGAACTTGCTACTTG 3'/ R 5' CAGGATGGAGGCATGAGCAT 3' Amplicon 160pb

ScPTR2

>CA300837

F 5' TCGCCATCCTGCTCTCCATC 3'/ R 5' TTCATGTCGGTGCTCCCCGT 3' Amplicon 214pb

ScNRT2.1

>CA094297

F 5' GATCATCCGGGAGAACCTG 3'/ R 5' CATGTGCTGGGTCCAGTCTT 3' Amplicon 274pb

ScNRT2.2

>CA094297

F 5' AAGAGAGAGAGACACA 3'/ R 5' ACGCAGGTGAAGAAGGACAT 3' Amplicon 222pb

ScNRA2.1

>CA151916

F 5' GACAAGGCGTGCCAGTTC 3'/ R 5' TTCCTCCTCTTCTCGACGAC 3' Amplicon 293pb

ScNIA (NADH) [EC:1.7.1.1]

>TC154605

Foward CATGATCTGCGGTGGGAG 3'/ R 5' GTACCACACCTTGAGCCTG 3' Amplicon 187pb

ScNIA (NADPH) [EC:1.7.1.3]

>CA163498

F 5' CCATTGGGCACATCGAGTA 3'/ R 5' GCCTGGATCACCTGGTACAC 3' Amplicon 127pb

ScGS2

>TC112908

F 5' CTGCCTGTGCTGAGTGAT 3'/ R 5' GGTCCTTGAAAATGGCTTGA 3' Amplicon 259pb

No experimento 3, as variedades tiveram aumento nos valores da atividade na nitrato redutase, nas doses altas tanto de folhas como de raízes, principalmente na SP80-3280, as duas variedades tiveram queda nas atividades, a partir da doses 10,0 Mm, mesma que marco um padrão no restante das variáveis estudadas. O resultado é reportado em cana-de-açúcar e outras espécies, como limite superior para as doses nutricionais da alguns estudos (SABINO-DONATO et al., 2004).

A influência das doses foi importante na comparação dos resultados de desempenho fotossintético, nas duas variedades. A RB83-5089 se destacou em três das variáveis indicadoras, na avaliação para as doses baixas. Já nas doses altas, só a SP80-3280 obteve significância em sete das variáveis indicadoras utilizadas nas leituras repetidas, onde se apresentaram dois padrões de resposta, o primeiro com a variável taxa de assimilação fotossintética (A) só ou associada com a condutância estomática (A/Gs), ou associada com a taxa de transpiração (A/E), as três deram as maiores respostas, com as doses de 25,0 mM.

Por outro lado, se estabeleceu outro grupo, formado pelas variáveis: diferencial de concentração de CO<sub>2</sub> na câmara (c); pressão de CO<sub>2</sub> corrigido (Can);

concentração subestomática de CO<sub>2</sub> (Ci) e razão da concentração de CO<sub>2</sub> subestomática/pressão de CO<sub>2</sub> corrigido (Ci/Can), os quais, com exceção da variável "c", que respondeu à dose 10,0 mM, o restante tiveram maior resposta nas doses de 1,0 e 2,5 mM, o que sugere, uma revisão do efeito das condições nas quais as plantas têm se desenvolvido, já que o mecanismo fornecedor de CO<sub>2</sub> responde melhor, quando submetido às concentrações menores na faixa das doses altas.

É reconhecido e aceito que uma alta taxa de assimilação de carbono favorece uma alta taxa de assimilação de Nitrogênio e vice versa (FERRARIO et al., 1995), mas se requer manter uma coordenação obrigatória entre os metabolismos do carbono (C) e do nitrogênio (N), (FERRARIO; VALADIER; FOYER, 1998), o que parece ter sido ajustado nas plantas, devido às condições de crescimento.

Em relação ao nitrato, além de nutriente, tem destacado outras atribuições no ambiente interno da planta, onde é assinalado seu papel homeostático, por um lado (MILLER; et al., 2007), assim como a matriz de sensores que sinalizam as interações dos metabolismos do carbono (C) e do nitrogênio (N), são estes mecanismos de sinalização que permitem à planta utilizar eficientemente (ou preservar) a energia necessária para conduzir o transporte e o metabolismo de C e N (XU et al., 2012), consequentemente, são dependentes do fornecimento de esqueletos de hidrocarbonetos, energia e equivalentes de redução derivados da fotossíntese (KROUK et al., 2010).

Em trigo no campo, sob condições de pouca luz as taxas de fotossíntese foram semelhantes em plantas deficientemente abastecidas com nitrogênio e plantas que foram bem fornecidas com o nutriente. Em contraste, quando as plantas foram submetidas à alta intensidade de luz, a taxa de fotossíntese foi inferior nas plantas deficientes em nitrogênio (CABRERA-BOSQUET, et al., 2009).

Em concordância com os aspetos vistos acima, os resultados de massa seca de raiz e parte aérea, nas doses altas, das duas variedades, tiveram a tendência de crescimento junto com as doses até 10 mM, após a qual, apresentaram queda. Entretanto, na RB83-5089, o índice de massa não apresentou diferenças nas doses baixas, e sim nas doses 2,5; 5,0 e 15,0 mM, na parte aérea. Por outro lado, a massa seca da parte aérea nas doses baixas foi mais informativa, na RB83-5089.

Por outro lado, o valor da razão raiz - parte aérea, para as variedades do experimento, não superaram o valor de 0,228 kg kg <sup>-1</sup>, que fora obtido na dose 0,05 mM para a variedade RB83-5089, o qual não superou valores reportados em plantas

de cana-de-açúcar com 50 dias, que alcançaram um máximo de 0,42 kg kg <sup>-1</sup> (SMITH et al., 2005).

No conteúdo de clorofila "a" a RB83-5089 foi a mais destacada nas doses baixas, e também com diferenças significativas nas doses 5,0 e 10,0 mM. Na clorofila "b" foi também a RB83-5089 a que obteve os maiores valores para as duas faixas de doses.

Nos valores da razão das clorofilas "a/b", as duas variedades expressaram padrões individuais típicos cada. Nas doses baixas, a RB 83-5089 não tive diferenças dentro das doses e sim entre as variedades. A SP80-3280 apresentou diferenças entre variedades e entre as doses. Nas doses baixas, a RB 83-5089 estive na faixa de 2,273 a 2,334, e a SP80-3280 na faixa 2,454 a 2,98. Em todas as doses altas, a SP80-3280 obteve valores extremamente altos, comportando-se como uma planta esciófila, numa faixa de valores que foi desde 1,79 na dose menor até 7,27 na dose mais alta.

### **5 CONCLUSÕES**

A atividade da nitrato redutase, apresentou, de forma geral, maior valor nas folhas do que nas raízes, evidenciando que não houve limitações na absorção e transporte pelo xilema até as folhas.

O nitrato teve efeito na composição nitrogenada dos tecidos e nos processos ligados à fotossíntese. As mudanças chegaram a provocar alterações tanto na condutância estomática quanto na fotossíntese.

Houve correspondência entre as doses nas duas faixas e os padrões de adaptação ao nível de luz, relacionados com a proporção e a razão das clorofilas.

Foi possível estabelecer que os níveis ótimos da fotossíntese, do conteúdo das clorofilas e da massa seca, apresentaram como máximo nas doses altas, a concentração de 10,0 mM de nitrato, para as duas variedades.

## **6 RECOMENDAÇÕES**

Recomendamos que, o ajuste das doses, principalmente as altas deverá ter um equilíbrio no sentido de compensar tanto a duração (quantidade) como a qualidade da luz, para experimentos similares e, principalmente, em variedades exigentes, considerando o máximo de 10,0 mM nas doses altas.

Em um experimento similar (caso dos estudos de expressão diferencial de genes, "time course" para as famílias de genes induzíveis ou outros), será importante incorporar medições de conteúdo de nitrogênio em folhas e raízes, avaliar a influência das doses na proporção das clorofilas, a eficiência na redistribuição do nitrogênio e no uso da água, para ter melhor compreensão das interações entre os metabolismos do Carbono e Nitrogênio nesta fase de crescimento.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

# A situação da produção de cana-de-açúcar no Panamá, comparada ao modelo de produção brasileiro

Desde sua chegada ao istmo do Panamá até os dias atuais, a cana-de-açúcar não tem sido objeto de programas de melhoramento genético em âmbito nacional. Tal como nos tempos antigos, os materiais avançados são trazidos ao país vindos de origens muito diversas, incluindo Barbados, Cuba, Porto Rico, México e Brasil (MURILLO et al., 2006).

Comparando o exemplo brasileiro ao Panamá, constatamos que a produção panamenha ficou estagnada entre os anos de 2001-2007, com uma produtividade média de 59 ton há<sup>-1</sup>. Numa retrospectiva de produção, este índice de produtividade é inferior aos valores reportados pela FAO, na safra de 1999, colhida nos principais países produtores (Austrália – 88,97 ton há<sup>-1</sup>; China – 85,30 ton há<sup>-1</sup>; México – 73,42 ton há<sup>-1</sup>; Brasil - 68,58 ton há<sup>-1</sup>; Índia – 68,01 ton há<sup>-1</sup>) (FAO, 1999; http://www.contraloria.gob.pa).

Esta tendência de estagnação da produtividade panamenha persistirá se não forem desenvolvidos programas locais de melhoramento genético da cana-de-açúcar (MURILLO et al., 2006).

Este cenário poderia ser alterado pelo

- Desenvolvimento de planos de seleção para variedades adaptadas às condições edafoclimáticos de cada zona de produção.
- º Por estudos ecofisiológicos e moleculares que visem no desempenho fotossintético e à otimização das adubações nitrogenada e fosfórica nas variedades cultivadas.

Recentemente (20 de abril de 2011), o parlamento e o governo panamenho aprovaram a Lei 42, que iniciou um processo de gestão com ênfase no uso de fontes alternativas aos combustíveis fósseis (Política Nacional de Hidrocarbonetos e Energias Alternativas). Esta nova política de promoção dos biocombustíveis, tem

entre seus objetivos principais a indústria canavieira visando a exportação de açúcar para os Estados Unidos. Em geral, o governo panamenho tem por objetivo reduzir o custo da conta do petróleo, além de aumentar a segurança alimentar e a proteção ao ambiente. De acordo com a Controladoria Geral do Panamá durante os três primeiros meses de 2012, o Panamá importo cerca de 221,000 litros de combustíveis fósseis, com um custo estimado de US\$ 291,694,000.

Este conjunto de iniciativas visa produzir 15 milhões de litros ano <sup>-1</sup> de etanol em 11,000 hectares da cultura, com a criação de cerca de 10,000 empregos já no ano 2013. (Informações da Secretaria Nacional de Energia da República do Panamá).

Dentre as variedades que na atualidade se planta nos canaviais do Panamá estão:

RAGNAR; B-76249; BJ-7262; B-74125; CP-742005; BT-72168; B-8709; Q-96; JÁ-60-5; SR-93-1418; SP79-2233; CP-722086; BJ-8859; UCW-5465; BT-65152; PINDAR; BR-81117; BJ-83140; BJ-84124; DB-83185; B-871027; B-83587. (Dados originados na empresa "Azucarera Nacional – Usina Santa Rosa" / http://www.azunal.com).

## 8 REFERÊNCIAS

AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFORMATION THEORY, 2., 1973, Budapest. **Proceedings...** Budapest: Akademiai Kiado, 1973. p. 267-281.

ANDREWS, M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 9, p. 511–519, 1986.

ANDREWS, M.; SPRENT, J.I.; RAVEN, J.A.; EADY, P.E. Relationships between shoot to root ratio, growth and leaf soluble protein concentration of *Pisum sativum*, *Phaseolus vulgaris* and *Triticum aestivum* under different nutrient deficiencies. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 22, p. 949–958, 1999.

ANDREWS, T.J.; LORIMER, G.H. Rubisco: Structure, mechanisms, and prospects for improvement. In 'The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise. Vol 10, Photosynthesis'. (Eds). MD Hatch and NK Boardman. Academic: New York. 1987, p. 131–218.

ARRUDA, P. Perspective of the sugarcane industry in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, p. 3–8, 2011.

ASHER. C.J.; EDWARDS, D.G. Moder solution culture techniques. In *Inorganic Plant Nutrition* (Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 15B), A. Lauchli and Bieleski, eds., Springer, Berlin, p. 94 – 119, 1983.

ASLAM M.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology**, Washington, v. 99, p. 1124-1133, 1992.

AZEVEDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, M.; VIEIRA, E. Nitrogênio em canaplanta, doses e fracionamento. **STAB**: açúcar, álcool e subprodutos, Piracicaba, v. 4, n. 5, p. 26–32, 1986.

BACHMANN, M.; HUBER, J.L.; LIAO, P.C.; GAGE, D.A.; HUBER, S.C. The inhibitor protein of phosphorylated nitrate reductase from spinach. *Spinacia oleracea* leaves is a 14-3-3 protein. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 387, p. 127–131, 1996.

BALDANI, J.I.; REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. A brief story of nitrogen fixation in sugarcane — reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 29, p. 417–423, 2002.

BEEVERS, L.; HAGEMAN, R.H. Nitrate reduction in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 20, p. 495-522, 1969.

BEHL R.; TISCHNER R.; RASCHKE, K. Induction of high capacity nitrate uptake mechanism in barley roots prompted by nitrate uptake through a constitutive low capacity mechanism. **Planta**, Berlin, v. 176, p. 235-240, 1988.

- BENDA, G.T.A.; RICAUD, C. The use of heat treatment for sugarcane disease control. **Proceedings International Society Sugar Cane Technology**, London, v. 16, p. 483-496, 1978.
- BJORKMAN, O. Comparative photosynthetic CO<sub>2</sub> exchange in higher plants. In: Hatch MD, Osmond CB, Slatyer RO, eds. Photosynthesis and photorespiration. New York, NY, USA: Wiley. 1970, p. 18–32.
- BOND, W.J. What limits trees in C<sub>4</sub> grasslands and savannas? **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**, Palo Alto, v. 39, p. 641–659, 2008.
- BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Futile cycling at the plasma membrane: a hallmark of low-affinity nutrient transport. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, p. 529–534, 2006.
- BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. Futile transmembrane  $NH_4^+$  cycling: a cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of India,** Allahabad, v. 98, p. 4255–4258, 2001.
- BUCHANAN B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. **Nitrate and other compounds serve as signals to regulate NR gene expression**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 820–822.
- CABRERA-BOSQUET, LI.; MOLERO, G.; NOGUÉS, S.; ARAUS, J.L. Water and nitrogen conditions affect the relationships of  $\Delta$  <sup>13</sup>C and  $\Delta$  <sup>18</sup>O to gas exchange and growth in durum wheat. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 55, p. 1633–1644, 2009.
- CALSA, T. Jr. FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (Saccharum spp.) leaves revealed alternative C<sub>4</sub> metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 63, p. 745–762, 2007.
- CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase biochemistry comes of age. **Plant Physiology**, Washington, v. 111, p. 355-361, 1996.
- CAMPOS, H. Estatística aplicada à experimentação com cana-de-açúcar. Piracicaba, FEALQ, 1984. 292 p.
- CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; 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**, Washington, v.127, p. 262–271, 2001.
- CHANDOK, M.R.; SOPORY, S.K. Phosphorylation/ dephosphorylation steps are key events in the phytochromemediated enhancement of nitrate reductase mRNA levels and enzyme activity in maize. **Molecular Genetics and Genomics**, Heidelberg, v. 251, p. 599–608, 1996.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; COUTO DE ABREU, H. M.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; LEE-BURNQUIST, W.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; DE OLIVEIRA-FIGUEIRA, A. V.; DE SOUSA-FILGUEIRAS, T.; GROSSI-DE-SÁ, M. DE F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; GUIMARÃES DE ANDRADE, M. L.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; DE CASTRO REINACH, F.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; DE CASTRO SILVA FILHO, M.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, Brasilia, v. 4, p. 62–89, 2011.

CHEESEMAN, J.M.; TANKOU, S.K. Nitrate reductase and growth of *Arabidopsis thalianaa* in solution culture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 143–152, 2004.

CHOLLET, R.; VIDAL, J.; O'LEARY, M.H. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 273–298, 1996.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, Maryland, v. 162, p. 156-9, 1987.

CHRISTIN, P.A.; SALAMIN, N.; SAVOLAINEN, V.; DUVALL, M.R.; BESNARD, G. C<sub>4</sub> photosynthesis evolved in grasses via parallel adaptive genetic changes. **Current Biology**, Cambridge, v. 17, p. 1241–1247, 2007.

COELHO, C.H.M.; MEDEIROS, A.F. A.; POLIDORO, J.C.; PONTES-XAVIER, R; RESENDE, A.; MUREB-QUESADA, D.; ALVES, B.J.R.; BODDEY, R.; URQUIAGA, S. Identificação de genótipos de cana-de-açúcar quanto ao potencial de contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 2, p. 37 – 40, 2003.

CONAB (2012) Acompanhamento da Safra Brasileira. http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/2\_levantamento2012\_

CONTRALORÍA GENERAL DE LA REPÚBLICA DE PANAMÁ. Estadística y

Censos Contraloría Nacional de la Republica de Panamá – 2012. Disponível em: <a href="http://www.contraloria.gob.pa/">http://www.contraloria.gob.pa/</a>. Acesso em: 24 maio 2012 cotton seedlings.

CRAMER, M.D.; LEWIS, O.A.M. The influence of Nitrate and Ammonium Nitrition on the Growth of Wheat (Triticum aestivum) and Maize (Zea mays) Plants. **Annals of Botany**, 72:359-365, 1993.

CRAWFORD, N. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, Rockville, v. 7, p. 859–868, 1995.

- CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, p. 389–395, 1998.
- CRUZ, C.; LIPS, S.H.; MARTINS-LOUÇÃO, M.A. Nitrogen assimilation and transport in carob plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 89, n. 3, p. 524–531, 1993.
- D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH, examples of sugarcane and banana. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 109, p. 27–33, 2005.
- D'HONT, A.; GLASZMANN, J.C. Sugarcane genome analysis with molecular markers, a first decade of research. **Proceedings of International Society of the Sugar Cane Technologists**, Queensland, v. 24, p. 556–559, 2001.
- D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, P.S.; BERDING, N. Characterization of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharun spp*) by molecular cytogenetics. **Mgg Molecular Genetics And Genomics**, Berlin, v. 250, p. 405–413, 1996.
- D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J.C. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (Saccharum spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, Heidelberg, v. 250, p. 405–413, 1996.
- DANIELS, J.; ROACH, B.T. Taxonomy and evolution. In: HEINZ, D.J. (Ed.). **Sugarcane improvement through breeding.** Amsterdam: Elsevier, 1987. p. 7–84,

Dennis, DH Turpin, DD Leferbvre and DB Layzell. Longman: Burnt Mill. 1997, p. 341–369.

dez2012.pdf. Acesso em: 05 outubro 2012

DOBERMANN, A.; CASSMAN, K. G. Cereal area and nitrogen use efficiency are drivers of future nitrogen fertilizer consumption. **Science China Life Sciences**, Beijing, v. 48, p. 745—758, 2005.

- DONATO, V.M.T.S.; ANDRADE, A.G. de; SOUZA, E.S. de; DE FRANÇA, J.G.E.; MACIEL, G.A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, nov. 2004.
- ENGELS, C.; MARSCHNER'S, H. Plant uptake and utilization of nitrogen. In: BACON, E.P. **Nitrogen fertilization in the environment**, New York: Marcel Dekker, 1995. p. 41-71.
- ESPEN, L.; NOCITO, F.F.; COCUCCI, M. Effect of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport and reduction on intracellular pH: an in vivo NMR study in maize roots. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 55, p. 2053–2061, 2004.
- EVANS J.R. Partitioning of nitrogen between and within leaves grown under different irradiances. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 16, p. 533–548, 1989.

- EVANS, J.R. Photosynthesis-the dependence on nitrogen partition. In; LAMBERS, H.; VAN DER PLAS. L.H.W. (Ed.). Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants. The Hague: SPB Academic Publishing, 1989. p. 493-508.
- EVANS, J.R. Photosynthetic acclimation and nitrogen partitioning in a lucerne canopy. II. Stability through time and comparison with a theoretical optimum. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 20, p. 69–82, 1993.
- EVANS, J.R.; SEEMANN, J.R. The allocation of protein-nitrogen in the photosynthetic apparatus: costs, consequences and control. In: BRIGGS, W. (Ed.). **Toward a broad understanding of photosynthesis.** New York: AR Liss, 1989. p. 183–205.
- EVANS, J.R.; TERASHIMA, I. Effects of nitrogen nutrition on electron transport components and photosynthesis in spinach. **Australian Journal of Plant Physiology**, Stuttgard, v. 14, p. 59–68, 1987.
- FAN, S.C.; LIN, C.S.; HSU, P.K.; LIN, S.H.; TSAY, Y.F. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.7, Expressed in Phloem, Is Responsible for Source-to-Sink Remobilization of Nitrate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 21, p. 2750–2761, 2009.
- FAN, X.; GORDON-WEEKS, R.; SHEN, Q.; MILLER, A. J. Glutamine transport and feedback regulation of nitrate reductase activity in barley roots leads to changes in cytosolic nitrate pools. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 6, p. 1333-1340, 2006.
- FAN, X.; JIA, L.; LI, Y.; SMITH, S.J.; MILLER, A.J.; SHEN, Q. Comparing nitrate storage and remobilization in two rice cultivars that differ in their nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 7, p. 1729-1740, 2007.
- FAN, X.; SHEN, Q.; MA, Z.; ZHU, H.; YIN, X.; MILLER, A.J. A comparison of nitrate transport in four different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Science in China Ser. C Life Sciences**, Beijing, v. 48, p. 897—911, 2005. Special issue.
- FAO. FAO production yearbook for 1999. Rome, 1999. p. 60.
- FASSBENDER, W.H. Química de Suelos con Énfasis en Suelos de América Latina. IICA San José Costa Rica. 119-167, 1978.
- FAURE-RABASSE, S.; LE DEUNFF, E.; LAINE, P.; MACDUFF, J.H.; OURRY, A. Effects of nitrate pulses on BNNRT1 and BnNRT2 genes: mRNA levels and nitrate influx rates in relation to the duration of N deprivation in *Brassica napus* L. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 375, p. 1711-1721, 2002.
- FERNANDES, A.C.; IRVINE, J. The Brazilian sugar and alcohol agroindustry. In: PROCEEDINGS OF THE COPERSUCAR INTERNATIONAL SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, Piracicaba. **Proceedings... Piracicaba:** Copersucar, 1987. p. 233–247.

- FERNANDEZ, E.; GALVAN, A.; QUESADA, A. Nitrogen assimilation and its regulation. In: ROCHAIX, J.D.; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.; MERCHANT, S. (Ed.). **Molecular biology of Chlamydomonas**: chloroplast and mitochondria. Dordrecht: Kluwer Academic, 1998. p. 637–659.
- FERRARIO, S.; VALADIER, M.H.; MOROT GAUDRY, J. F.; FOYER, C.H. Effects of constitutive expression of nitrate reductase in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* L. in response to varying nitrogen supply. **Planta**, Berlin, v. 196, p. 288–294, 1995.
- FERRARIO-MÉRY, S.; VALADIER, M.H.; FOYER, C.H. Overexpression of nitrate reductase in tobacco delays drought-induced decreases in nitrate reductase activity and mRNA. **Plant Physiology**, Washington, v. 117, p. 293–302, 1998.
- FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica Biophysics Acta**, Amsterdam, v. 1465, p. 219–235, 2000.
- FOYER, C.H. (Editor); NOCTOR, G. (Editor). Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism. Secaucus, NJ, USA: Kluwer Academic Publishers, 2003, p. 305.
- FOYER, C.H.; PARRY, M.; NOCTOR, G. Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 585–593, 2003.
- FRANCO, A.R.; CARDENAS, J.; FERNANDEZ, E. Ammonium (methylammonium) is the co-repressor of nitrate reductase in *Chlamydomonas reinhardtii*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 176, p. 453–456, 1984.
- FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO. A cana-deaçúcar redesenhada. **Pesquisa FAPESP**, São Paulo, p. 28–35, 2000.
- GACETA OFICIAL DIGITAL. Disponível em: <a href="http://www.gacetaoficial.gob.pa/">http://www.gacetaoficial.gob.pa/</a>. Acesso em: 15 jun. 2012
- GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 55, p. 295–306, 2004.
- GALLARDO, F.; CÁNOVAS, F.M. H<sup>+</sup> Fluxes in nitrogen assimilation by plants handbook of plant growth ph as the master variable. Amsterdam: Marcel Dekker, 2002. 446 p.
- GALLOWAY, J.N. **The global nitrogen cycle**: past, present and future. Special Issue, 2005. p.669—677. (Life Sciences 2005, 48)
- GALLOWAY, J.N.; ABER, J.D.; ERISMAN, J.W.; SEITZINGER, S.P.; HOWARTH, R.W.; COWLING, E.B.; COSBY, B.J. The nitrogen cascade, **BioScience**, Berkeley, v. 53, p. 341-356, 2003.

- GALLOWAY, J.N.; DENTENER, F.J.; CAPONE, D.G.; BOYER, E.W.; HOWARTH, R.W.; SEITZINGER, S.P.; ASNER, G.P.; CLEVELAND, C.C.; GREEN, P.A.; HOLLAND, E.A.; KARL, D.M.; MICHAELS, A.F.; PORTER, J.H.; TOWNSEND, A.R.; VÖRÖSMARTY, C.J. Nitrogen cycles: Past, present and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, p. 153-226, 2004.
- GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E. Eukaryotic nitrate and nitrite transporters. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 58, p. 225–233, 2001.
- GALVÁN, A.; QUESADA, A.; FERNÁNDEZ, E. Nitrate and nitrite are transported by different specific transport system and by a bispecific transporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Biological Chemistry**, London, v. 271, p. 2088–2092, 1996.
- GEHLEN, J.; PANSTRUGA, R.; SMETS, H.; MERKELBACH, S.; KLEINES, M.; PORSCH, P.; FLADUNG, M.; BECKER, I.; RADEMACHER T.; HÄUSLER, R. E. Effects of altered phosphoenolpyruvate carboxylase activities on transgenic C<sub>3</sub> plant Solanum tuberosum. **Plant Molecular Biology**, London, v. 32, p. 831–848, 1996.
- GHANNOUM, O.; EVANS, J.R.; VON CAEMMERER, S. Nitrogen and water use efficiency of C4 plants. In: AGEPATI, S. RAGHAVENDRA; ROWAN F.; SAGE (Ed.). C<sub>4</sub> Photosynthesis and elated CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms. New York: Springer Science+Business Media B.V, 2011. chap. 8, p. 129–146.
- GLASS, A.D.M.; BRITTO, D.T.; KAISER, B.N.; KINGHORN, J.R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M.Y.; UNKLES, S.E.; VIDMAR, J.J. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 53, n. 370, p. 855–864, 2002.
- GOLDENBERG, J. The Brazilian Biofuels Industry. Fall, v. 4, p. 91-107, 2009.
- GOYAL, S.S.; HUFFAKER, R.C. The uptake of NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by intact wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. I. Induction and kinetics of transport systems. **Plant Physiology**, London, v. 82, p. 1051-1056, 1986.
- GRIVET, L.; DANIELS, C.; GLASZMANN, J.C.; D'HONT, A. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication. **Etnobotânica Research & Applications**, London, v. 2, p. 9-17, 2004.
- GUERRERO, M.G.; LARA, C. Assimilation of inorganic nitrogen. In: FAY, P. (Ed). **The cyanobacteria.** Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p. 163-186.
- GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M.; LOSADA, M. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. **Annual Review Plant Physiology**, London, v. 32, p. 169–204, 1981.
- GUOHUA, X.; FAN, X.; MILLER, A. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, London, v.63, p. 153–182, 2012.

- HA, S.; MOORE, P.H.; HEINZ, D.; KATO, S.; OHMIDO, N.; FUKUI, K. Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor in situ hybridization and imaging methods. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 39, p. 1165–1173, 1999.
- HARADA, H.; KUROMORI, T.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K.; LEIGH, R.A. Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in Arabidopsis leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, AtCLC-c, to variation in nitrate levels, **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 405, p. 2005-2014, 2004.
- HATCH, M.D. C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 895, p. 81–106, 1987.
- HATCH, M.D.; KAGAWA, T.; CRAIG, S. Subdivision of C<sub>4</sub>-pathway species based on differing C<sub>4</sub> acid decarboxylating systems and ultrastructural features. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v 2, p. 111–128, 1975.
- HECK, E.U.; WIEMKEN, A. Vacuoles as a storage compartment for nitrate in barley leaves. **Nature**, London, v. 289, p. 292–293, 1981.
- HENDRE, K.R.; IYER, R.S.; KOTWAIN, M.; KLUSPE, S.S.; MASCARENHAS, A.F. Rapid multiplication of sugarcane by tissue culture. **Sugar Cane**, London, v. 1, p. 5-8, 1983.
- HIGGINS, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review of Cell Biology,** Palo Alto, v. 8, p. 67-113, 1992.
- HIKOSAKA, K.; TERASHIMA, I. A model of the acclimation of photosynthesis in the leaves of C3 plants to sun and shade with respect to nitrogen use. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 18, p. 605–618, 1995.
- HIREL, B.; TÉTU, T.; LEA, P.J.; DUBOIS, F. Improving nitrogen use efficiency in crops for sustainable agriculture. **Sustainability**, New York, v. 3, p. 1452-1485, 2011.
- HIROSE, T.; WERGER, M.J.A. Nitrogen use efficiency in instantaneous and daily photosynthesis of leaves in the canopy of Solidago altissima stand. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 70, p. 215–222, 1987.
- HO C.H.; LIN, S.H.; HU, H.C.; TSAY, Y.F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, Cambridge, v. 138, p. 1184–94, 2009.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, H. **The water culture method for growing plants without soil.** Berkeley: California Experimental Agriculture Station, 1950. 32 p. (Circular, 347).
- HOCHSTEIN, L.I.; TOMLINSON, G.A. The enzymes associated with denitrification. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v. 42, p. 231–261, 1988.

- HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A.J.; WATT, D.A.; CRAMER, M.D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 277, p. 85–96, 2005.
- HOFFMANN, H.P.; SANTOS DIAS, E.G. BASSINELLO, A.V.; VIEIRA-SANCHES, M.A. Variedades RB de Cana-de-açúcar, 1.ed Araras: CCA/UFSCar, 2008, 30p.
- HOLE, D.J.; EMRAN, A.M.; FARES, Y.; DREW, M.C. Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. **Plant Physiology**, Washington, v. 93, p. 642-647, 1990.
- HOTTA, C.T.; LEMBKE, C.G.; DOMINGUES, D.S.; OCHOA, E.A.; CRUZ, G.M.Q.; MELOTTO-PASSARIN, D.M.; MARCONI, T.G.; SANTOS, M.O.; MOLLINARI, M.; MARGARIDO, G.R.A.; CRIVELLARI, A.C.; DOS SANTOS, W.D.; DE SOUZA, A.P.; HOSHINO, A.A.; CARRER, H.; SOUZA, A.P.; GARCIA, A.A.F.; BUCKERIDGE, M.S.; MENOSSI, M.; VAN SLUYS, M.A.; SOUZA, G.M. The Biotechnology Roadmap for Sugarcane Improvement. Tropical Plant Biology, New York, v. 3, p. 75–87, 2010.
- HUBER, J.L.; HUBER, S.C.; CAMPBELL, W.H.; REDINBAUGH, M.G. Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. **Archives of the Biochemistry Biophysics**, Dordrecht, v. 296, p. 58–65, 1992.
- HUMBERT, R.P. **The growing of sugar cane.** Amsterdam New York: Elsevier, 1963. 710 p.
- HWANG, C.F.; LIN, Y.; D'SOUZA, T.; CHENG, C.L. Sequences necessary for nitrate-dependent transcription of Arabidopsis nitrate reductase genes. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, p. 853–862, 1997.
- INMAN-BAMBER, N.G.; BONNETT, G.D.; SPILLMAN, M.F.; HEWITT, M.L.; JACKSON, J. Increasing sucrose accumulation in sugarcane by manipulating leaf extension and photosynthesis with irrigation. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 59, p. 13–26, 2008.
- INMAN-BAMBER, N.G.; MUCHOW, R.C.; ROBERTSON, M.J. Dry matter partitioning of sugarcane in Australia and South Africa. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 76, p. 71–84, 2002.
- ISKANDAR, H.M.; SIMPSON, R.S.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, London, v. 22, p. 325-337, 2004.
- JAMES, E.K.; REIS, V.M.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 45, p. 757-766, 1994.

- KAISER, W.M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase activity by photosynthesis. **Plant Physiology**, London, v. 96, p. 363–367, 1991.
- KENWARD, M.G.; ROGER, J.H. Small sample inference for fixed effects from restricted maximum likelihood. **Biometrics**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 983–997, 1997.
- KHAMIS, S.; CHAILLOU, S.; LAMAZE, T. CO<sub>2</sub> assimilation and partitioning of carbon in maize plants deprived orthophosphate. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 41, p. 1619–1625, 1990.
- KITAJIMA, K.; HOGAN, K.P. Increases of chlorophyll a/b ratios during acclimation of tropical woody seedlings to nitrogen limitation and high light. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 26, p. 857–865, 2003.
- KLEINHOFS, A.; WARNER, R.L. Advances in nitrate assimilation. **The Biochemistry of Plants**, San Diego, v. 16, p. 89–115, 1990.
- KOPRIVA, S.; KOPRIVOVA, A. Sulfate assimilation and glutathione synthesis in C<sub>4</sub> plants. **Photosynthesis Research**, London, v. 86, p. 363–372, 2005.
- KRAISE, T.; GRAS, D. E.; GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 1455–1466, 2011.
- KROUK, G.; CRAWFORD, N.M.; CORUZZI, G.M.; TSAY, Y-F. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. **Current Opinion in Plant Biology**, New York, v. 13, p. 266–273, 2010.
- KRUSE, J.; HETZGER, I.; HANSCH, R.; MENDEL, R-R.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C. Elevated pCO<sub>2</sub> favours nitrate reduction in the roots of wild-type tobacco (Nicotiana tabacum cv. Gat.) and significantly alters N-metabolism in transformants lacking functional nitrate reductase in the roots. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 53, p. 2351–2367, 2002.
- KU, M.S.B.; AGARIE, S.; NOMURA, M.; FUKAYAMA, H.; TSUCHIDA, H.; ONO, K.; HIROSE, S.; TOKI, S.; MIYAO, M.; MATSUOKA, M. High-level expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic rice plants. **Nature Biotechnology**, London, v. 17, p. 76–80, 1999.
- KURIMOTO, K.; MILLAR, A.H.; LAMBERS, H.; DAY, D.A.; NOGUCHI, K. Effect of respiratory homeostasis on plant growth in cultivars of wheat and rice. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 27, n. 7, p. 853-862, 2004.
- LAWLOR, D.W. Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 53, p. 773–787, 2002.

- LEA, P.J. Nitrogen metabolism. In: LEA, P.J.; LEEGOOD, R.C. (Ed.). **Plant biochemistry and molecular biology**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley, 1999. p. 163-191.
- LEE, R.B.; DREW, M.C. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. II. Effects of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 37, p. 1768-1779, 1986.
- LEE, R.B.; RATCLIFFE, R.G.; SOUTHON, T.E. <sup>31</sup>P NMR measurement of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationship with phosphorous status and phosphate fluxes. **Journal of Experimental Botany**, London, v. 41, p. 1063–1078, 1990.
- LEEGOOD, R.C.; VON CAEMMERER, S.; OSMOND, C.B. Metabolite transport and photosynthetic regulation in  $C_4$  and CAM plants. In 'Plant Metabolism'. (Eds). DT . 1997.
- LI, J.Y.; FU, Y.L.; PIKE, S.M.; BAO, J.; TIAN, W.; ZHANG, Y.; CHEN, C.Z.; ZHANG, Y.; LI, H.M.; JIN. H.; LI, L.G.; SCHROEDER, J.I.; GASSMANN, W.; GONG, J.M. The Arabidopsis Nitrate Transporter NRT1.8 Functions in Nitrate Removal from the Xylem Sap and Mediates Cadmium Tolerance. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, p. 1633–1646, 2010.
- LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosyntheticb biomembranes. **Methods in Enzymology**, New York, v. 148, p. 350-382, 1987.
- LIMA, M.L.; GARCIA, A.A.; OLIVEIRA, K.M.; MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; DE SOUZA, C.L. Jr.; DE SOUZA, A.P. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum* spp.). **Theoretical and Applied Genetics**, Heidelberg, v. 104, p. 30–38, 2002.
- LIN, Y.; HWANG, C.F.; BROWN, J.B.; CHENG, C.L. 5' proximal regions of *Arabidopsis* nitrate reductase genes direct nitrateinduced transcription in transgenic tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 106, p. 477–484, 1994.
- LINDQUIST, J.L.; BARKER, D.C.; KNEZEVIC, S.Z.; MARTIN, A.R.; WALTERS, D.T. Comparative Nitrogen Uptake and Distribution in Corn and Velvetleaf (Abutilon theophrasti). **Weed Science**, Lawrence, v. 55, p. 102-110, 2007.
- LINKA, N.; WEBER, A.P. Intracellular metabolite transporters in plants. **Molecular Plant**, New York, v. 3, n. 1, p. 21-53, 2010.
- LIU, J.; HAN, L.; CHEN, F.; BAO, J.; ZHANG, F.; MI, G. Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (Zea mays L.). **Plant Science**, Amsterdam, v. 175, p. 272–282, 2008.
- LIU, K-H.; HUANG, C-Y.; TSAY Y-F. CHL1 Is a dual-affinity nitrate transporter of arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. **The Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 865–874, 1999.

MACKENZIE, F.T. Our Changing Planet: An Introduction to Earth System Science and Global Environmental Change. 2nd ed. Upper Saddle River (NJ): Prentice-Hall. 1998, 486 p.

MAKINO, A.; OSMOND, B. Effect of nitrogen nutrition on nitrogen partitioning between chloroplast and mitochondria in pea and wheat. **Plant Physiology**, London, v. 96, p. 355-362, 1991.

MANNERS, J.M.; CASU, R.E. Transcriptome Analysis and Functional Genomics of Sugarcane. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, p. 9–21, 2011.

MARSCHESNER'S, H. **Mineral nutrition of higher plants.**2<sup>nd</sup> ed. New York: Academic Press, 1995. 862 p.

MARTÍNEZ-ESPINOSA, R.M.; LLEDÓ, B.; FRUTOS, C.; MARHUENDA-EGEA; BONETE, M.J. The effect of ammonium on assimilatory nitrate reduction in the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. **Extremophiles**, Tokyo, v. 11, n. 6, p. 759–767, 2007.

MARTINS DE OLIVEIRA, J.C.; REICHARDT, K.; BACCHI, O.S.; TIMM, L.C.; DOURADO-NETO, D.; OCHEUSE TRIVELIN, P.C.; TOMINAGA, T.T.; DE CASTRO NAVARRO, R.; DE CÁSSIA PICCOLO, M.; MEIRA CÁSSARO, F.A. Nitrogen dynamic in a soil-sugar cane system. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 467-472, 2000.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; CHARDON, F. Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in Arabidopsis thaliana. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 2131–2142, 2011.

MATSUMARA, T.; SAKAKIBARA, H.; NAKANO, R.; KIMATA, Y.; SUGIYAMA, T.; HASE, T. A nitrate-inducible ferredoxin in maize roots: Genomic organization and differential expression of two non-photosynthetic ferredoxin apoproteins. **Plant Physiology**, Rockville, v. 114, p. 653–660, 1997.

MATSUOKA, S.; FERRO, J. Á.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Heidelberg, v. 45, p. 372–381, 2009.

MATSUOKA, S.; FRANCO-GARCIA, A.A. Sugarcane underground organs: going deep for sustainable production. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, p. 22–30, 2011.

MCINTYRE, G.I. The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 24, p. 103–118, 1997.

MEINZER, F.C.; PLAUT, Z.; SALIENDRA, N.Z. Carbon isotope discrimination, gas exchange and growth of sugarcane cultivars under salinity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, p. 521 – 526, 1994.

MEINZER, F.C.; ZHU, J. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C<sub>4</sub> CO<sub>2</sub> concentrating system, and therefore quantum yield, in *Saccharum* (sugarcane) species. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 1227-1234, 1998.

MENGEL, K. AND E.A. KIRBY. 1987. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute. Worblaufen-Bern, Switzerland. pp. 306.

MENDEL, R. Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 18, p. 33–69, 1997.

MENDES-SOUZA, G.; BERGES, H.; BOCS, S.; CASU, R.; D'HONT, A.; FERREIRA, J. E.; HENRY, R.; MING, R.; POTIER, B.; VAN SLUYS, M-A.; VINCENTZ, M.; PATERSON, A.H. The sugarcane genome challenge: strategies for sequencing a highly complex genome. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, p. 145–156, 2011.

MILLARD, P. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 11, p. 1–8, 1988.

MILLER, A.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S.; WELLS, D. Nitrate transport and signaling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2297-2306, 2007.

MILLER, A.J.; CRAMER, M.D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 274, p. 1–36, 2004.

MILLER, A.J.; FAN, X.; SHEN, Q.; SMITH, S. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 111–119, 2007.

MOORE, P.; IRVINE, J. Genomic mapping of sugarcane and its potential contribution to improvement and to selection of new varieties. **South African Sugar Technologists' Association**, Mount Edgecombe, v. 63, p. 96-102, 1991.

MOORHEAD, G.B.G.; SMITH, C.S. Interpreting the plastid carbon, nitrogen, and energy status. A role for PII? **Plant Physiology**, Washington, v. 133, p. 492–498, 2003.

MORENO-VIVIÁN, C.; CABELLO, P.; MARTÍNEZ-LUQUE, M.; BLASCO, R.; CASTILLO, F. Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. **Journal of Bacteriology**. Washington, v. 181, p. 6573-6584, 1999.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 15, p. 473–497, 1962. MURILLO, C.; OROZCO, J.; HERNÁNDEZ, G.; SÁNCHEZ, Y. R. **Evaluación ambiental y de la capacidad institucional de Panamá frente al libre comercio**. San José: Universidad Nacional de Costa Rica, Centro Internacional en Política Económica, 2006. 75 p.

- NAIR, V.; NAIR, S.; SREENIVASAN, T.; MOHAN, M. Analysis of genetic diversity and phylogeny in Saccharum and related genera using RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Amsterdam, v. 46, p. 73-79, 1999.
- NAVA, A.D.; RAMÍREZ-RAMÍREZ, I.; PEÑA-VALDIVIA, C B.; DÍAZ-VILLASEÑOR, G.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V.A. Características del intercambio de gases en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). **Revista Chapingo Serie Horticultura**, Chapingo, v. 15, n. 2, p. 119-126, 2009.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. LEHNINGER. PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA, 5<sup>ta</sup> edición, Edit. OMEGA, Madrid, p. 1296, 2009.
- OLIVEIRA, K.M.; PINTO, L.R. MARCONI, T.G.; MOLLINARI, M.; ULIAN, E.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; BURNQUIST, W.; GARCIA, A.A.F.; SOUZA, A.P. Characterization of new polymorphic functional markers for sugarcane. **Genome**, Montreal, v. 52, p. 191-209, 2009.
- PAO, S.S.; PAULSEN, I.T.; SAIER, M.H. JR. Major facilitator superfamily. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 1, p. 1-34, 1998.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, Inc. New York., p. 273, 1989.
- PAULSEN, I.T.; SLIWINSKI, M.K.; SAIER JUNIOR, M.H. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 277, n. 3, p. 573-592, 1998.
- PENG, S.; BURESH, R.J.; HUANG, J.; YANG, J.; ZOU, Y.; ZHONG, X.; WANG, G.; ZHANG, F. Strategies for overcoming low agronomic nitrogen use efficiency in irrigated rice systems in China. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 96, p. 37–47, 2006.
- PIMENTEL GOMES, F. Curso de Estatística Experimental. 11ª ed., Piracicaba, Livraria Nobel S. A., 1985 465 p.
- PONTES XAVIER, R. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio na produção sustentável da cultura de cana-de-açúcar. 2007. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- POORTER, H.; REMKES, C.; LAMBERS, H. Carbon and nitrogen economy of 24 wild species differing in relative growth rate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 94, p. 621-627, 1990.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T.; MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter and of an H<sup>+</sup>-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 384, p. 1023-1031, 2003.

- RADCHUK, R.; RADCHUK, V.; GÖTZ, K.P.; WEICHERT, H.; RICHTER, A.; EMERY, R.J.N.; WESCHKE, W.; WEBER, H. Ectopic expression of PEP carboxylase in Vicia narbonensis seeds: effects of improved nutrient status on seed maturation and transcriptional regulatory networks. **The Plant Journal**, Oxford, v. 51, p. 819–839, 2007.
- RADEMACHER, T.; HÄUSLER, R.E.; HIRSCH, H-J.; ZHANG, L.; LIPKA, V.; WEIER, D.; KREUZALER, F.; PETERHÄNSEL, C. An engineered phosphoenolpyruvate carboxylase redirects carbon and nitrogen flow in transgenic potato plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, p. 25–39, 2002.
- RAJU, K.S.; SHARMA, N.D.; LODHA, M.L. Inhibition of assimilatory nitrate uptake by ammonium ions in *Azorhizobium caulinodans* IRBG 46. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 5, p. 119–121, 1996.
- RANJITH, S.A.; MEINZER, F.C.; PERRY, M.H.; THOM, M. Partitioning of carboxylase activity in nitrogen-stressed sugarcane and its relationship to bundle sheath leakiness to CO<sub>2</sub>, photosynthesis and carbon isotope discrimination Aust. **Journal of Plant Physiology**, Berlin, v. 22, p. 903-911, 1995.
- RAO, I.M.; FREDEEN, A.L.; TERRY, N. Leaf phosphate status, photosynthesis, and carbon partitioning in sugar beet. III. Diurnal changes in carbon partitioning and carbon export. **Plant Physiology**, Rockville, v. 92, p. 29-36, 1990.
- RASTOGI R.; BACK, E.; SCHNEIDERBAUER, A.; BOWSHER, C.G.; MOFFAT, B.; ROTHSTEIN, S.J. A 330 bp region of the spinach nitrite reductase gene promoter directs nitrate-inducible tissue-specific expression in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v. 4, p. 317–326, 1993.
- RASTOGI, R.; BATE, N.J.; SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.J. Footprinting of the spinach nitrite reductase gene promoter reveals the preservation of nitrate regulatory elements between fungi and higher plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 34, p. 465–476, 1997.
- RAVEN, J.A.; SMITH, F.A. Nitrogen assimilation and transport in vascular land plants in relation to intercellular pH regulation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 121, p. 19-32, 1976.
- REDINBAUGH, M.G.; CAMPBELL, W.H. Glutamine synthetase and ferredoxindependent glutamate synthase expression in the maize (Zea mays) root primary response to nitrate. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, p. 1249–1255, 1993.
- REDINBAUGH, M.G.; CAMPBELL, W.H. Higher plant responses to environmental nitrate. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 82, p. 640–650, 1991.
- REDINBAUGH, M.G.; CAMPBELL, W.H. Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize root plastids: Induction of 6-phosphogluconate activity, protein and transcript levels. **Plant Science**, Shannon, v.134, p. 129–140, 1998.

REIS JÚNIOR, F.B.; REIS, V.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria Herbaspirillum spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum spp.*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 219, p. 153-159, 2000.

RICHARDSON, D.J.; WATMOUGH, N.J. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 3, p. 207–219, 1999.

RITCHIE, S.W.; REDINBAUGH, M.G.; SHIRAISHI, N.; VERBA, J.M.; CAMPBELL, W.H. Identification of a maize root transcript expressed in the primary response to nitrate: Characterization of a cDNA with homology to reductase. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 26, p. 679–690, 1994.

ROACH, B.T. Origin and improvement of the genetic base of sugarcane. **Australian Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings**, Queensland, v. 11, p. 34–47, 1989.

ROACH, B.T.; DANIELS, J.A. Review of the origin and improvement of sugar cane. In: SUGARCANE BREEDING WORKSHOP, 1987, Piracicaba. Piracicaba: Copersurcar, 1987. p. 1–33.

ROBINSON, N.; FLETCHER, A.; WHAN, A.; CRITCHLEY, C.; VON WIRÉN, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Sugar cane genotypes differ in internal nitrogen efficiency. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 34, n. 12, p. 1122-1129, 2007.

RODRÍGUEZ, L.A.; VALDÉS, R.; MEDINA, R.; ZAMORA, R. Actividad *in vivo* de la enzima nitrato reductasa en hojas de cafetos bajo diferentes condiciones de luz y dos densidades de plantación. **Agronomía Tropical**, Maracay, v. 52, n. 1, p. 75-87, 2002.

RODRIGUEZ, R.; LARA, C.; GUERRERO, M.G. Nitrate transport in the cyanobacterium Anacystis nidulans R2. **Biochemical Journal**, London, v. 282, p. 639–643, 1992.

ROSSATO, J.A.D.S. Jr.; FERNANDES, A.O.; MUTTON, M.J.R.; HIGLEY, L.G.; MADALENO, L.L. Sugarcane response to two biotic stressors: *Diatraea saccharalis* and *Mahanarva fimbriolata*. Proc Int Soc Sug-Cane Technol, Queensland, v. 27, p. 1–5, 2010.

RICHARDSON, D.J., WATMOUGH, N.J., Inorganic Nitrogen Metabolism in Bacteria. **Curr Opin Biol**. v3, p. 207-219, 1999.

SABINO DONATO, V.M.T.; ANDRADE, A.G. de; SOUZA, E.S. de; FRANÇA, J.G.E. de; ALVES-MACIEL, G. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

SAGE, R.F. The evolution of  $C_4$  photosynthesis. **New Phytologist**, Oxford, v. 161, p. 341–370, 2004.

- SAGE, R.F.; PEARCY, R.W; SEEMANN, J.R. The Nitrogen Use Efficiency of C(3) and C(4) Plants: III. Leaf Nitrogen Effects on the Activity of Carboxylating Enzymes in *Chenopodium album* (L.) and *Amaranthus retroflexus* (L.). **Plant Physiology**, Washington, v. 85, p. 355-359, 1987.
- SAKAKIBARA, H.; KOBAYASHI, K.; DEJI, A.; SUGIYAMA, T. Partial characterization of the signaling pathway for the nitratedependent expression of genes for nitrogen-assimilatory enzymes using detached leaves of maize. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 38, p. 837–843, 1997.
- SALIENDRA, NZ.; MEINZER, F.C.; PERRY, M.; THOM, M. Associations between partitioning of carboxylase activity and bundle sheath leakiness to CO<sub>2</sub>, carbono isotope discrimination, photosynthesis and growth in sugarcane. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 47, p. 907 914, 1996.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, p. 1851–1854, 2003.
- SANTOS, A.S. 2008. Doenças causadas por fungos. In: Dinardo-Miranda LL, Vasconcelos ACM, Landell MGA (eds) Cana-de-açúcar. Instituto Agronomico de Campinas, Campinas, p 882.
- SAS INSTITUTE. **SAS/STAT software:** version 9.2. Cary, 2008. Disponível em: <a href="http://www.sas.com/">http://www.sas.com/</a>. Acesso em: 12 set. 2011.
- SCHEIBLE, W.R.; GONZALEZ-FONTES, A.; LAUERER, M.; MULLER-ROBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 9, p. 783-798, 1997b.
- SCHEIBLE, W.R.; LAUERER, M.; SCHULZE, E-D.; CABOCHE, M.; STITT, M. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot—root allocation in tobacco. **The Plant Journal**, Oxford, v. 11, p. 671–691, 1997a.
- SECRETARÍA NACIONAL DE ENERGÍA. Disponível em: <a href="http://www.energia.gob.pa/">http://www.energia.gob.pa/</a>. Acesso em: 01 jul. 2012
- SKOCZEK, H.G. Effect of light and nitrates on nitrate reductase activity and stability in seedling leaves of selected barley genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Heidelberg, v. 20, n. 2, p. 155-160, 1998.
- SMITH, C.S.; WELJIE, A.M.; MOORHEAD, G.B.G. Molecular properties of the putative nitrogen sensor PII from Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, Oxford, v. 33, p. 353–360, 2003.
- SMITH, D.M.; INMAN-BAMBER, N.G.; THORBURN, P.J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 169-183, 2005.

- SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M. Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 225-253, 1990.
- STEWART, G.R.; HEGARTY, E.E.; SPECHT, R.L. Inorganic nitrogen assimilation in plants of Australian rainforest communities. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 74, p. 26–33, 1988.
- STEWART, G.R.; JOLY, C.A.; SMIRNOFF, N. Partitioning of inorganic nitrogen assimilation between roots and shoots of Cerrado and forest trees in contrasting plant communities of south east Brazil. **Oecologia**, Berlin, v. 91, p. 511–517, 1992.
- STITT, M. Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 2, p. 178–186, 1999.
- STITT, M.; SCHEIBLE, W-R. Nitrate acts as a signal to control gene expression, metabolism and biomass allocation. In: KRUGER N.; HILL, S.A.; RATCLIFFE, R.G. (Ed.). **Regulation of metabolism.** Dordrecht: Kluwer Academic, 1999. p. 275–306.
- SUBIRÓS-RUIZ, F. **El cultivo de la caña de azúcar**. San José: UNED, 1995. 419 p. SUGIYAMA, K.; HAYAKAWA, T.; KUDO, T.; ITO, T.; YAMAYA, T. Interaction of the N-acetylglutamine kinase with a PII-like protein in rice. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, p. 1768–1778, 2004.
- TAIS, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. São Paulo:Editora Artmed, 2009. 687 p.
- TANAKA, A.; ITO, H.; TANAKA, R.; TANAKA, N.K.; YOSHIDA, K.; OKADA, K. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. **National Academy of Sciences. Proceedings**, Washington, v. 95, p. 12719–12723, 1998.
- TAPIA, M.M.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Active glutamine synthetase is required for ammonium or glutamine promoted prevention of nitrate and nitrite reduction in the cyanobacterium *Phormidium laminosum*. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 94, n. 2, p. 241–246, 1995.
- TAPIA, M.M.; LLAMA, M.J.; SERRA, J.L. Regulation of nitrate assimilation in the cyanobacterium Phormidium laminosum. **Planta**, Heidelberg, v. 198, p. 24–30, 1996.
- TAYLOR, L., NUNES-NESI, A.; APARSLEY, K; LEISS, A.; LEACH ,G. et al. Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. **Plant Phys.** 62:641-52, 2010.
- TCHERKEZ, G.G.B.; FARQUHAR, G.D.; ANDREWS, T.J. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. **National Academy of Sciences. Proceedings**, Washington, v. 103, p. 7246–7251, 2006.

TEAKLE, L.N.; TYERMAN, S.D. Mechanisms of CI- transport contributing to salt tolerance. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 33, p. 566–589, 2010.

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

TREVISAN, S.; BORSA, P. BOTTON, A.; VAROTTO, S.; MALAGOLI, M.; RUPERTI, B.; QUAGGIOTTI, S. Expression of two maize putative nitrate transporters in response to nitrate and sugar availability. **Plant Biology**, Berlin, v. 10, p. 462–475, 2008.

TRIMBOLI, A.J.; BARDER, M.J. Assimilatory nitrate reductase: reduction and inhibition by NADH/NAD<sup>+</sup>. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Maryland, v. 315, n. 1, p. 48-53, 1994.

TSAY, Y.F.; CHIU, C.C.; TSAI, C.B.; HO, C.H.; HSU, P.K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, p. 2290–2300, 2007.

TSAY, Y.F.; SCHROEDER, J.I.; FELDMANN, K.A.; CRAWFORD, N.M. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. **Cell**, Cambridge, v. 72, p. 705–713, 1993.

TUKEY, J.W. Comparing individual means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 5, p. 99-114, 1957.

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

VAN DER LEIJ, M.; SMITH, S.J.; MILLER, A.J. Remobilization of vacuolar stored nitrate in barley root cells. **Planta**, Berlin, v. 205, p. 64–72, 1998. VAN DILLEWIJN, C. **Botany of sugar cane**. Wageningen: Veenman & Zonen, 1952. 371 p.

VAN MAANEN, J.M.S.; WELLE, I.J.; HAGEMAN, G.; DALLINGA, J.W.; MERTENS, P.L.J.M.; KLEINJANS, J.C.S. Nitrate contamination of drinking water: relationship with *HPTR* variant frequency in lymphocyte DNA and urinary excretion of *N*-nitrosamines. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 104, p. 522–528, 1996.

VENKATRAMAN, R.S.T.S. Germination and preservation of sugarcane pollen. **Agricultural Journal of India**, Calcutta, v. 17, p. 127–132, 1922.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1/4, p. 1-7, 2001.

VETTORE, A.L.; DA SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; FERRO, M.I.T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, É.A.; LEMOS, M.V.F.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANÇA, S.C.; BACCI, JR., M.;

- GOLDMAN, M.H.S.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.A.; SIQUEIRA, W.J.; VAN SLUYS, M-A.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.P.N.; FERRO, J.A.; SILVEIRA, H.C.S.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.M.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.M.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; DE OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; DE ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.A.; DE ROSA, JR, V.E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S.M.Z.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.M.; BRAGA, M.D.V.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, New York, v. 13, p. 2725–2735, 2003.
- VICENTINI, R.; DEL BEM, L.E.V.; VAN SLUYS, M.A.; NOGUEIRA, F.T.S.; VINCENTZ, M. Gene content analysis of sugarcane public ESTs reveals thousands of missing coding-genes and an unexpected pool of grasses conserved ncRNAs. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 5, n. 2, p. 199-205, 2012.
- VIÑEGLA, B. Efecto de la radiación ultravioleta sobre actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del carbono y el nitrógeno en macroalgas y fanerógamas marinas. 2000. 404 p. Tesis (Doctoral) Universidad de Málaga, Málaga, 2000.
- WALCH-LIU, P.; IVANOV, I.; FILLEUR, S.; GAN, Y.; REMANS, T.; FORDE, B.G. Nitrogen Regulation of Root Branching. **Annals of Botany**, Oxford, v. 97, p. 875–881, 2006.
- WANG, R.; GUEGLER, K.; LABRIE, S.T.; CRAWFORD, N.M. Genomic analysis of a nutrient response in Arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12: 1491–1509, 2000.
- WILKINSON S.; WILLIAM, D. Manipulation of the apoplastic pH of intact plants mimics stomatal and growth responses to water availability and microclimatic variation. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 3, p. 619-631, 2008.
- WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, p. 659–688, 2001.
- XU, G., FAN, X., MILLER, A. Plant Nitrogen Assimilation and use efficiency. **Annu Rev Plant Biol.** v 63, p. 153-1982, 2012
- YAMAZAKI, M.; WATANABE, A.; SUGIYAMA, T. Nitrogen-regulated accumulation of mRNA and protein for photosynthetic carbon assimilating enzymes in maize. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 27, p. 443-452, 1986.
- ZHANG, H.; FORDE, B.G. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, Washington, v. 279, p. 407–409, 1998.

ZHANG, H.; FORDE, B.G. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, p. 51–59, 2000.

ZHANG, H.; JENNINGS, A.; BARLOW, P.W.; FORDE, B.G. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. **National Academy of Sciences. Proceedings**, Washington, v. 96, p. 6529–6534, 1999.