UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

Luís Henrique Damasceno Serezino

Piracicaba
2015

LUÍS HENRIQUE DAMASCENO SEREZINO

Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)

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

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba

2015

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Serezino, Luís Henrique Damasceno
Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)/ Luís Henrique Damasceno Serezino; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2015.
112 p. : il.

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

1. Plantas produtoras de açúcar 2. Processo de absorção 3. Transportadores de nitrogênio I. Título

CDU 633.61 : 631.84

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Luís Henrique e Márcia,
que com muito carinho e apoio, nunca mediram esforços
para me dar o bem mais precioso... O Estudo!
Somente eu e minhas irmãs sabemos tudo
o que vocês fizeram em prol da
nossa formação e educação.

Minha imensa e eterna gratidão!

Agradeço também às minhas irmãs, pelo incessante apoio.
Aos meus avós, Tios, Tias, primos e primas, agradeço
também pela confiança creditada em mim!

AGRADECIMENTOS

Gostaria primeiramente de agradecer a Deus, por me dar saúde, força e sabedoria para finalizar mais etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira pela oportunidade de trabalhar no laboratório, por acreditar e confiar no meu trabalho, e pelo conhecimento passado nestes mais de 3 anos de convivência.

Aos técnico do Laboratório de Melhoramento de Plantas do CENA/USP: Raquel Orsi, Felippe Campana, Wlamir Godoy, José Alves, Paulo Cassieri e Inês Possignolo, pela atenção e ajuda dada. Sem isso, não seria possível a realização dos experimentos. Muito obrigado.

Aos meus companheiros do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Alessandra Koltun, Bruna Factor, Daniela Bardella, Danielle Scotton, Deborah Nishimura, Fabiana Manarelli, Fernando Ferreira, Flávia Bento, Grabriela Juliano, Isabela Camargo, Jamile Silva, Juliana Leles, Karina Brandão, Roberto Camargo e Thaísa Pinheiro, pela ótima convivência e pelos bolos na salinha de cima. De maneira especial queria agradecer: Layanne Souza, Marielle Vitti e Melissa Alves pela amizade e pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos de posto: André Tagliaferro, Eduardo Bressan, Joni Lima, Lucas Anjos e Renato Ferreira, pelo conhecimento não só científico transmitido a mim. Pela amizade, companheirismo e suporte. Serei eternamente grato por tudo o que fizeram por mim.

Ao Prof. Dr. Victor Vitorello e à técnica Mariana Belloti por toda a atenção e infraestrutura dada na realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli por estar sempre à disposição e por todo o suporte na realização de análises em seu laboratório.

À FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa e suporte financeiro necessário para a realização deste trabalho.

Aos professores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) e da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ) por contribuírem com a minha formação.

Aos funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) pelo apoio e atenção dada.

Aos meus pais, Luís Henrique e Márcia, por todo amor, carinho, atenção, companheirismo, compreensão, e por serem quem são: meus maiores exemplos! Amo muito vocês! Espero um dia ser capaz de retribuir tudo o que vocês me proporcionaram.

Às minhas irmãs, Bruna e Amanda, por serem minhas eternas parceiras, por estarem sempre ao meu lado. Amo vocês!

À toda minha família: tios, tias, primos, primas, pela confiança que tiveram em mim e pelo apoio incondicional. Em especial, vô Zé (*in memorian*) e vó Elza, grandes torcedores e incentivadores. Amo vocês!

À Família Perdição, por ser tão bem recebido, pelos momentos vividos, pela paciência que tiveram comigo, pela construção da minha pessoa. Valeu, moçaaaada!

Aos meus amigos da faculdade, que mesmo longe sempre estiveram presentes na minha vida. Sem o apoio de vocês, não teria chegado aqui. Valeu, povo!

Aos meus amigos de São João, que também foram essenciais na minha conquista!

A todos que participaram de maneira direta e indireta desta conquista...

Deixo aqui meus sinceros e imensos agradecimentos!

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

SEREZINO, L. H. D. **Caracterização fisiológica e transcricional dos processos de aquisição e remobilização de nitrato em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.)**. 2015. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A expansão da área de cultivo da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) para solos marginais e a necessidade de manutenção da alta produtividade tem levado a maior aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura. Esta prática, porém, incorre em altos custos financeiros e ambientais. Comparado a outras culturas, cana-de-açúcar possui baixa resposta a aplicação de fertilizantes nitrogenados, mas as causas desta baixa eficiência no uso de N (NUE) permanecem desconhecidas. Na tentativa de compreender os mecanismos envolvidos no NUE em cana-de-açúcar, este trabalho realizou a caracterização fisiológica dos processos de absorção de nitrato e remobilização de N por estudos de cinética de absorção e experimentos de translocação de ^{15}N. Além disso, analisou-se o perfil de expressão de genes codificadores de transportadores de nitrato (*NRT*s - *NITRATE TRANSPORTERS*). Plantas da cultivar 'SP80-3280' foram expostas à condições distintas de suplemento de N para investigar a regulação do processo de aquisição. Além de comprovar a menor eficiência da cana-de-açúcar na aquisição de nitrato quando comparada com amônio, foi demonstrada a presença de sistema de transporte de alta afinidade (HATS, *High Affinity Transport System*) para ambas as fontes de N presentes em raízes, induzido sob baixas concentrações externas de N e/ou sob baixo *status* de N na planta. Observou-se que amônio regula negativamente a absorção de nitrato, modulando a expressão dos genes envolvidos neste processo. Em plantas sob condições de deficiência de N (-N) foi verificada a regulação tardia do HATS responsável pela aquisição de nitrato. A ausência de correlação entre o influxo de ^{15}N e acúmulo de transcritos de transportadores de nitrato sugere a existência de uma regulação pós-transcricional dos transportadores do HATS em raízes submetidas a provisão de nitrato. Para caracterizar o processo de remobilização, plantas foram submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N na tentativa de identificar o mecanismo pelo qual nitrato pode ser regulado durante este processo. Apesar da reduzida eficiência na aquisição e estoque de nitrato, cana-de-açúcar possui a capacidade de utilizar nitrato como fonte de N, e em condições suficientes de suplemento de N, nitrato e amônio são utilizados como fonte de N. Sob restrição de N, porém, nitrato apresenta maior fluxo em raízes e colmos, enquanto que amônio ainda permanece como fonte de N em folhas jovens devido a alteração no carregamento de nitrato no xilema. Todavia, o suplemento de nitrato a ser reduzido e assimilado em folhas parece ter origem no colmo. Portanto, a modulação da expressão dos transportadores *NRT* assegura a alocação de nitrato em cana-de-açúcar quando N é limitante em solos.

Palavras-chave: Cinética de absorção. HATS. Nitrato. *NRT*s. NUE. Remobilização.

ABSTRACT

SEREZINO, L. H. D. **Physiological and transcriptional characterization of the process of nitrate uptake and remobilization in sugarcane (*Saccharum spp.*).** 2015. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

The expansion of sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivated area to marginal lands and the need to maintain high yield have led to increasing application of nitrogen fertilizers. However, this practice represents high economic and environmental costs. Compared to other crops, sugarcane displays a low response to N fertilization, but the causation of the low nitrogen use efficiency (NUE) remains unknown. To understand the mechanism involved in NUE, this study was carried out to conduct the physiological characterization of nitrate uptake and N remobilization in sugarcane by uptake kinetic analysis and translocation experiments using ^{15}N. Further, the expression profile of genes encoding nitrate transporters (*NRT*s - *NITRATE TRANSPORTERS*) involved in both processes was determined. Plantlets of cultivar 'SP80-3280' were exposed to various N supplement conditions to investigate the regulation of the uptake process. The lower efficiency in nitrate acquisition compared to ammonium was corroborated and extended for low N conditions. The occurrence in sugarcane roots of high affinity uptake systems (HATS, *High Affinity Transport System*) for both N sources,, induced at low external concentrations of N and/or low N status in the plant was confirmed. Ammonium negatively regulates nitrate uptake by modulating the expression of genes involved in this process. Plants under N deficiency (-N) exhibited a late regulation of HATS responsible for nitrate uptake. The lack of correlation between ^{15}N influx and transcript accumulation of nitrate transporter genes suggests the existence of a post-transcriptional regulation of HATS in roots subjected to nitrate resupply. To characterize the remobilization process, plants were submitted to contrasting conditions of N availability to identify the mechanisms by which nitrate may be affected during this process. Despite the low efficiency of nitrate uptake and storage, sugarcane demonstrates the ability to use nitrate as N source. In N sufficient conditions (+N), ammonium and nitrate are used as N source. Under restriction of N, however, nitrate has increased flow in roots and stems, while ammonium remains as N source to young leaves by change in nitrate loading into the xylem. However, the source of the nitrate to be reduced and assimilated in leaves appears to be originated from the culm. Therefore, modulation of *NRT* transporters expression ensures nitrate allocation in sugarcane when N is limited in soils.

Keywords: HATS. Nitrate. *NRT*s. NUE. Uptake kinetic. Remobilization.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15
2. REVISÃO DA LITERATURA 16
2.1 Fertilizantes Nitrogenados 16
2.2 Cana-de-açúcar 16
2.3 Uso eficiente de nitrogênio 18
2.4 Transporte de Nitrogênio 19
2.4.1 Transportadores de amônio (*AMTs - AMMONIUM TRANSPORTERS*) 21
2.4.2 Transportadores de nitrato (*NRT/ PTR - NITRATE TRANSPORTERS/ PEPTIDE TRANSPORTERS*) 22
3. MATERIAIS E MÉTODOS 29
3.1 Material vegetal e micropropagação 29
3.2 Estudos da cinética de absorção de nitrogênio pela raiz por influxo rápido de ^{15}N 32
3.3 Estudos de remobilização de nitrogênio 34
3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA 35
3.5 Identificação de genes da família *NRT/PRT (NITRATE TRANSPORTERS/ PEPTIDE TRANSPORTERS)* 36
3.6 Desenho de iniciadores para genes da família *NRT/PRT* (*NITRATE TRANSPORTERS/ PEPTIDE TRANSPORTERS*) 36
3.7 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) 37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 38
4.1 Caracterização do processo de absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar 38
4.1.1. Eficiência na absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar 39
4.1.2. Regulação do transporte de nitrato em raízes de cana-de-açúcar submetidas à deficiência de nitrogênio 43
4.1.3. Regulação do processo de absorção de nitrato por amônio em raízes de cana-de-açúcar 50
4.1.4. Regulação do transporte de nitrato em raízes de cana-de-açúcar durante provisão de nitrato 57
4.2 Caracterização do processo de remobilização de nitrato em raízes de cana-de-açúcar 67
5. CONCLUSÃO 93
REFERÊNCIAS 94
ANEXO 103

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura agrícola de grande importância econômica para o Brasil, sendo utilizada principalmente para a produção de açúcar e etanol combustível, empregado na substituição de combustíveis fósseis. Tais características tem motivado a constante expansão das áreas cultivadas para regiões com solos marginais, acarretando uma maior utilização de fertilizantes à base de nitrogênio (N) para manter a produtividade. Porém, para manter a competitividade do combustível, o balanço energético na produção de cana-de-açúcar deve ser positivo, e os altos custos financeiros e energéticos para a produção de fertilizantes nitrogenados, além dos impactos ambientais gerados por esta prática, devem ser considerados. Portanto, fica clara a necessidade de buscar novas soluções visando o aumento da produtividade e a maior eficiência na utilização desses fertilizantes.

A resposta da cana-de-açúcar à aplicação de fertilizantes nitrogenados é baixa quando comparada a outras plantas cultivadas (ROBINSON et al., 2011), e as perdas de N aplicado no solo podem chegar a 50% (TRIVELIN et al., 2002). Comparada ao sorgo e ao milho, a cana-de-açúcar possui menor eficiência na absorção e estoque de nitrato em seus tecidos, justificando assim a grande perda de N no solo e a sua baixa eficiência de uso de N (NUE) (ROBINSON et al., 2011). No entanto, as causas fisiológicas e genéticas destas baixas eficiências ainda permanecem desconhecidas. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar fisiologicamente a regulação do influxo/absorção de nitrato de acordo com o *status* de N da planta e fontes inorgânicas deste nutriente por meio de estudos de cinética de absorção com ^{15}N-nitrato em raízes de cana-de-açúcar. Pela exposição de plantas a ^{15}N por longo período, foi caracterizado também o processo de transporte de nitrato na parte aérea, de acordo com a disponibilidade de N. Após a caracterização fisiológica dos processos de absorção e de transporte de nitrato nos diversos tecidos, foram conduzidos estudos do perfil transcricional de genes ortólogos da família gênica *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*), relacionados aos processos de absorção, assimilação e remobilização de nitrato em raízes e parte aérea de cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fertilizantes Nitrogenados

O advento da produção sintética de fertilizantes nitrogenados pelo processo 'Haber-Boch' no início do século XX facilitou o crescimento dramático da produtividade na agricultura moderna (GALLOWAY; COWLING, 2002; TILMAN et al., 2002). A crescente demanda mundial por alimentos e por fontes renováveis de energia têm levado a produção e ao uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados na agricultura contemporânea (VITOUSEK et al., 2009). Anualmente, a produção de fertilizantes promove a introdução de aproximadamente 120 milhões de toneladas de N_2 atmosférico na agricultura, seja na forma de fertilizantes nitrogenados ou pelo cultivo de leguminosas (fixação biológica) (ROCKSTROM, 2009), com diversas consequências ambientais. Estima-se que as perdas de N no sistema solo-planta sejam em torno de 50% e 70% (PEOPLES et al., 1995), resultando na contaminação de solos, corpos de água e de ecossistemas marinhos, devido principalmente à lixiviação de nitrato (TILMAN, 1999; SCHRÖDER et al., 2004; VITOUSEK et al., 2009; FOLEY et al., 2011); na perda da biodiversidade (DIRZO; RAVEN, 2003); na contaminação da atmosfera pela emissão de gases causadores do efeito estufa, como o óxido nítrico e a amônia (TILMAN et al., 2001; GALLOWAY et al., 2008; BURNEY et al., 2010), e no constante aumento do N reativo em ecossistemas terrestres (AUSTIN et al., 2000; MARTINELLI; FILOSO, 2008). Considerando esses aspectos, a necessidade premente de melhorar a eficiência do uso de fertilizantes a base de N em plantas cultivadas representa um grande desafio para a agricultura moderna (TILMAN et al., 2001; SIMMONS et al., 2008; ROCKSTROM, 2009; FOLEY et al., 2012).

2.2 Cana-de-açúcar

A crescente preocupação com a segurança energética e o aquecimento global gerou a necessidade de substituição do consumo de combustíveis fósseis por biocombustíveis renováveis (TILMAN et al., 2009; MILLER, 2010; FLAVELL et al., 2011). É neste contexto que o Brasil possui destaque mundial devido à cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) empregado na produção de bioetanol combustível (BALDANI et al., 2002). A localização geográfica do país garante intensa radiação solar e fonte de água durante todo o ano para a produção de bioenergia. A agroindústria canavieira possui grande importância econômica,

sendo responsável por mais de US$20 bilhões/ano, tornando-se um dos setores de maior geração de empregos diretos e indiretos no país. O Brasil é responsável por 25% da produção mundial de cana-de-açúcar, sendo o maior produtor mundial (UNICA, 2009). Espera-se para 2014/2015, uma safra de aproximadamente 642,1 milhões de toneladas de cana-de-açúcar moída (CONAB, 2014). Vale ressaltar a flexibilidade do mercado da indústria canavieira, visto que a produção de cana pode ser direcionada para produção do etanol combustível e/ou para a de açúcar. Nesta última safra, a produção total foi dividida em 43,6% para produção de açúcar e 56,4% para etanol (UNICA, 2014). Segundo Berg (2004), desde o início do programa etanol brasileiro (ProÁlcool), os custos de produção de etanol diminuíram em 75%, enquanto que o rendimento por hectare aumentou em 60% e a produção de etanol aumentou em 30 vezes. Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) a produção de etanol atingiu 25,7 bilhões de litros nesta última safra. Somado ao aumento crescente de produtividade na indústria canavieira, a grande quantidade de terras inexploradas, ou pouco produtivas, permite a incorporação de novas áreas para a produção de bioenergia, sem afetar aquelas dedicadas à produção de alimentos (BRASIL, 2006). A região centro-oeste do Brasil oferece potencial para expansão da cultura canavieira; porém esta região apresenta estresse hídrico pronunciado e solos marginais (WACLAWOVSKY et al., 2010).

A falta de cultivares de alto rendimento nas condições de solos marginais e a tentativa da manutenção da alta produtividade da cultura canavieira têm acarretado no aumento do consumo de fertilizantes a base de N. No total, cerca de 30,2 milhões de toneladas de fertilizante nitrogenado foram utilizados em todo o Brasil no ano de 2014 (ANDA). Apesar da melhoria dos sistemas de fertilização da cana-de-açúcar, com a otimização no processo de aplicação e disponibilização do N, e o presumível benefício da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (de OLIVEIRA et al., 1999; de CASTRO GAVA et al., 2001; TRIVELIN et al., 2002; SIMONETE et al., 2003; MENDES, 2006; OLIVEIRA et al., 2007), as perdas de N no solo podem ainda chegar a 50% (TRIVELIN et al., 2002), o que sugere uma baixa eficiência na absorção de N pela cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011). Ou seja, apesar da cana-de-açúcar ser considerada a cultura tropical mais adequada para a produção de biocombustíveis, as grandes quantidades aplicadas de N no solo levantam dúvidas sobre a sustentabilidade da produção, e estão em desacordo com uma cultura baseada na redução da emissão de carbono (ROBINSON et al., 2011).

A relação entre N e o acúmulo de biomassa em plantas cultivadas é dependente da regulação de múltiplos processos fisiológicos. A absorção de N e a assimilação de carbono via fotossíntese, afetando crescimento da planta e alocação de C e N entre órgãos, são processos fundamentais para o acúmulo de biomassa (GASTAL; LEMAIRE, 2002). Em cana-de-açúcar, a deficiência de N reduz significativamente o crescimento e a produtividade (MUCHOW et al., 1996). A limitação de N no solo durante o desenvolvimento conduz a menores níveis de N nas folhas e, como consequência, ao acúmulo de fotoassimilados, que exercem *feedback* negativo na fotossíntese, causando a redução no crescimento e produtividade (HARTT, 1970; MUCHOW et al., 1996; van HEERDEN et al., 2010). Por outro lado, o excesso de fertilização de N pode diminuir o acúmulo de sacarose nos colmos durante o desenvolvimento (de RESENDE et al., 2006), devido aos desvios de esqueletos de C para a via de assimilação de N (STITT et al., 2002).

Para a maioria das cultivares de cana-de-açúcar, ocorre um acúmulo de N mais acentuado no início do desenvolvimento. Experimentos em campo utilizando fertilizantes nitrogenados marcados (^{15}N) demonstraram que na 'cana-planta' apenas 40% do N total absorvido/metabolizado é derivado do fertilizante, enquanto que na 'cana-soca' pode chegar a 70% na fase vegetativa de desenvolvimento (da SILVEIRA; CROCOMO, 1990; FRANCO et al., 2011). Durante a fase de maturação, ocorre um decréscimo acentuado do N total em cana-de-açúcar, o que sugere que a absorção e transporte de N na planta possui papel fundamental principalmente durante a fase vegetativa de desenvolvimento de cana-de-açúcar (FRANCO et al., 2011).

2.3 Uso eficiente de nitrogênio

O processo de uso eficiente de nitrogênio (NUE) é dependente da eficiência de absorção de fontes de N do solo, assim como, da eficiência na utilização de N, a qual compreende os processos de assimilação e remobilização de N durante o desenvolvimento da planta (GOOD et al., 2004; LEA;AZEVEDO, 2006; HIREL et al., 2007; FAN et al., 2007). O processo de assimilação de N parece ter uma função essencial para aumentar NUE em cereais. A análise fisiológica de um duplo mutante para Glutamina Sintetase (GS1) citossólica de milho (*gln1;3 gln1;4*) indicou a função da isoforma GS1.3 na formação de grãos de milho independentemente da fertilização de N (MARTIN et al., 2006). A superexpressão dessa isoforma em milho levou a maior produção de grãos quando as plantas foram submetidas à

alta fertilização de N (MARTIN et al., 2006). Plantas transgênicas de tabaco com superexpressão da GS também apresentaram maior acúmulo de biomassa (OLIVEIRA et al., 2002). No entanto, em cana-de-açúcar, não foi observada uma correlação direta entre assimilação de N e o processo de NUE pela análise de uma população segregante resultantes do cruzamento entre *Saccharum officinarum* e a cultivar comercial Q165[A] , a qual apresenta maior NUE quando cultivada em altas concentrações de N (ROBINSON et al., 2007). Esse melhor desempenho para NUE, contudo, não estava relacionado à atividade da GS para os genótipos segregantes, sugerindo que a atividade dessa enzima parece ter pouco impacto na eficiência para uso de N na cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2007). Logo, esses resultados indicam que cana-de-açúcar difere de cereais, cujos produtos são grãos, como milho e arroz (GALLAIS; HIREL, 2004; COQUE et al., 2008; TABUCHI et al., 2007; TAMURA et al., 2010; FAN et al., 2007). Com essa base, é possível sugerir que a eficiência na aquisição de N pode ter grande contribuição para processo de NUE em cana-de-açúcar.

2.4 Transporte de Nitrogênio

Plantas absorvem fontes orgânicas e inorgânicas de N presentes no solo, sendo o amônio e nitrato as principais formas inorgânicas adquiridas pelas raízes (MILLER et al., 2007; MARSCHNER, 2012). Fertilizante nitrogenado é aplicado na forma de uréia ou nitrato de amônio, geralmente com uma única aplicação no início do ciclo da cultura. A uréia é rapidamente convertida em amônio ou em nitrato (WOOD et al., 2010). Grande parte do nitrato absorvido é transportada para a parte aérea, onde é reduzido a nitrito pela Nitrato Redutase (NR) no citoplasma, sendo depois reduzido a amônio pela Nitrito Redutase (NiR) nos plastídeos e pela Glutamina Sintetase (GS) (LAM et al., 1996). O amônio derivado da redução do nitrato, ou resultante diretamente da absorção, é assimilado em aminoácidos via ciclo GS/GOGAT (Glutamina-2-oxoglutarato Aminotransferase) (LAM et al., 1996).

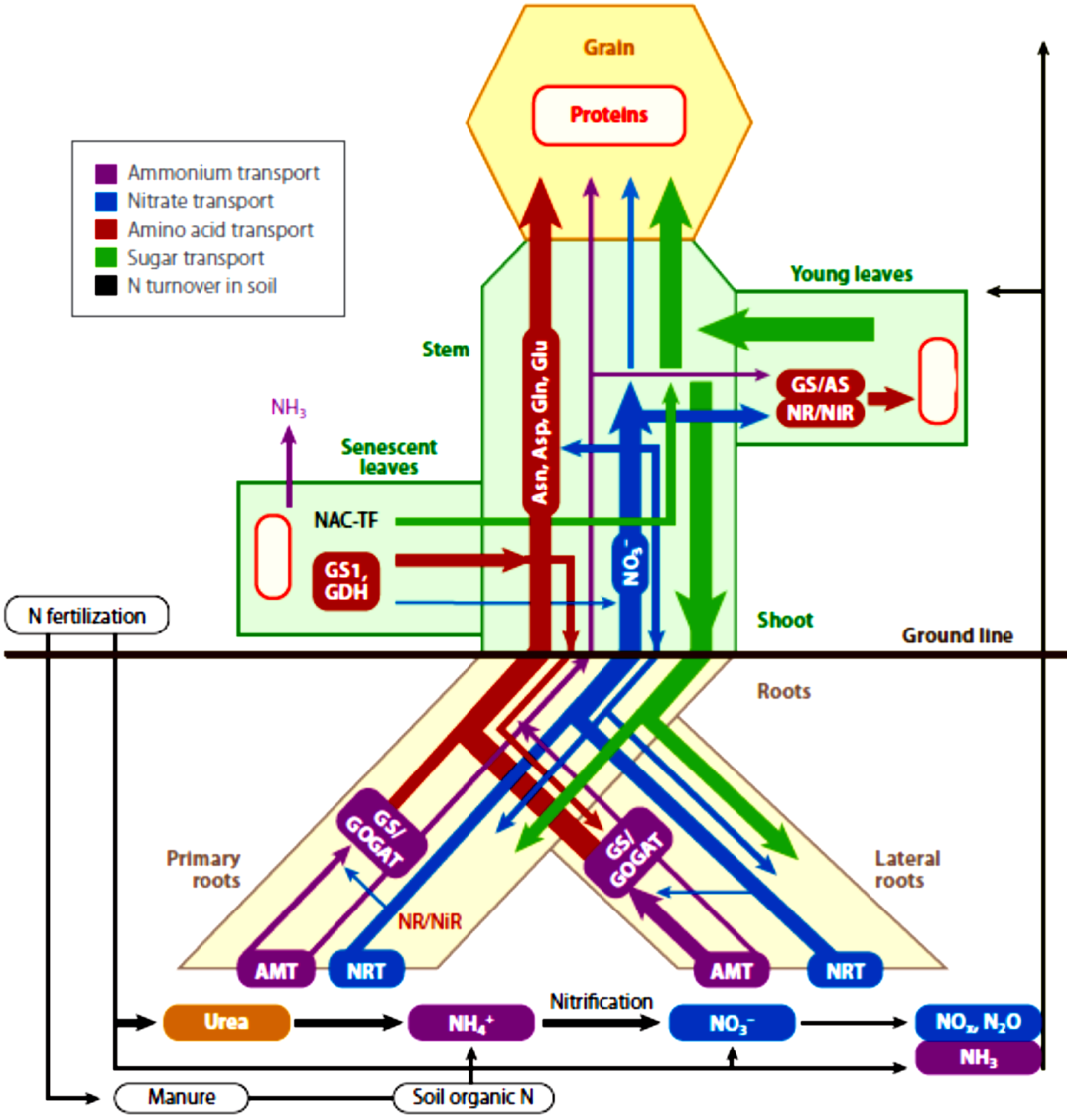


Figura 1 - Rotas esquemáticas de absorção de N da rizosfera, incluindo a fonte de fertilizante nitrogenado a ser adquirido, principalmente na forma de amônio e nitrato pelas raízes, transporte e assimilação, e remobilização no interior da planta (XU et al., 2012).

Em solos cultivados, a magnitude do N inorgânico pode variar na faixa de micromolar (µM) a millimolar (mM) (GLASS et al., 2001; MILLER et al., 2007). A aquisição de amônio e nitrato em plantas ocorre por meio de transportadores de membrana, que podem ser classificados quanto à afinidade por seu substrato, sendo que os transportadores de alta afinidade (*High Affinity Transporter System* ou HATS) são responsáveis pela aquisição de N em concentrações menores que 1 mM, enquanto que os transportadores de baixa afinidade (*Low Affinity Transporter System* ou LATS) realizam o transporte de forma não saturável para concentrações de N acima de 1 mM (GLASS et al., 2002). Em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* e *Oryza sativa*, os principais transportadores que

participam da absorção de N em alta afinidade (HATS) são conhecidos (FRAISIER et al., 2000; CEREZO et al., 2001; LOQUÉ; von WIRÉN, 2004; YAN et al., 2011).

2.4.1 Transportadores de amônio (*AMTs - AMMONIUM TRANSPORTERS*)

A família de genes responsável pela absorção de amônio, fonte preferencial de N para a maioria das plantas, é denominada *AMTs* (*AMMONIUM TRANSPORTERS*) (GAZZARRINI et al., 1999). Famílias gênicas de *AMTs*, bem como o local de expressão, foram identificados em genoma de plantas como *Arabidopsis thaliana* (6 membros de genes *AMT*) (Figura 2), *Solanum Lycopersicum* (4 *AMT*), *Oryza sativa* (12 *AMT*), *Glycine max* (16 *AMT*), *Medicago truncatula* (6 *AMT*) (LOQUÉ; VON WIRÉN, 2004; RUFFEL et al., 2008; KOBAE et al., 2010; LI et al., 2009), e alguns membros identificados em *Lotus japonicus* (ROGATO et al., 2008), *Sorghum bicolor* (KOEGEL et al., 2013) e milho (GU et al., 2013). Com base nas *ESTs* presentes em bancos de dados de sequências expressas de cana-de-açúcar, foram identificados homólogos aos 6 genes *AMTs* de arabidopsis em cana-de-açúcar, de acordo com o Dr. Joni Esrom Lima[1].

[1] Informação fornecida por J. E. Lima no CENA/USP em Piracicaba, em 2014.

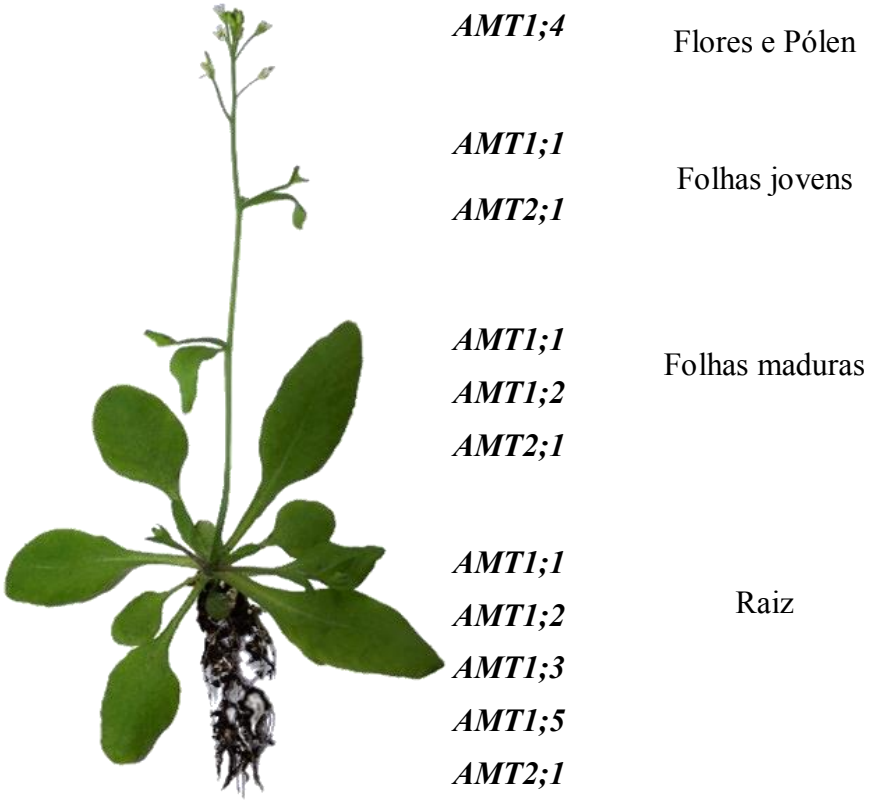


Figura 2 - Representação esquemática da localização de expressão preferencial dos genes *AMTs* em *Arabidopsis* (GAZZARRINI et al., 1999; SOHLENKAMP et al., 2002; YUAN et al., 2007).

As diversas proteínas transportadoras da família *AMT* apresentam afinidades distintas pelo amônio e atuam de forma aditiva no processo de aquisição de amônio pelas raízes (YUAN et al., 2007). Estudos de absorção de ^{15}N-amônio em mutantes duplos de arabidopsis demonstraram que os transportadores *AMT1;1* e *AMT1;3* têm maior capacidade para absorção de amônio, sendo responsáveis por 70% do amônio total absorvido, enquanto que o transportador *AMT1;2* confere cerca de 25% da absorção dessa forma de N pelas raízes (LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007). Outro transportador, o *AMT1;5* que possui baixa capacidade para transporte, com K_m de 4,5 μM, também promove a entrada de amônio em células radiculares (YUAN et al., 2007).

2.4.2 Transportadores de nitrato (*NRT/ PTR - NITRATE TRANSPORTERS/ PEPTIDE TRANSPORTERS*)

Os sistemas agrícolas modernos são baseados em grandes entradas de nitrogênio inorgânico (N), com amônio (NH_4^+), a principal fonte de N aplicada (GALLOWAY et al.,

2008; SCHLESINGER, 2009). Porém, por meio da atividade microbiana, o amônio é convertido em nitrato (NO_3^-) em um processo denominado nitrificação, se tornando assim a forma de N mais abundante na maioria dos solos cultivados (MILLER et al., 2007). O transporte de nitrato ocorre principalmente pela ação de transportadores da família *NRT/PRT* (*NITRATE TRANSPORTERS/ PEPTIDE TRANSPORTERS*) (CEREZO et al., 2001). No genoma de arroz foi predita a existência de uma família gênica com cerca de 80 membros, enquanto que arabidopsis há 53 membros da subfamília *NRT1* (TSAY et al., 2007) (Figura 3). Dentre os 53 membros da subfamília *NRT1* identificados em arabidopsis, 9 proteínas NRT1 já foram funcionalmente caracterizadas como transportadores de nitrato (GOJON et al., 2009). Para o transporte de alta afinidade, foram identificados 7 membros da subfamília *NRT2* em arabidopsis e 4 membros em arroz, milho e sorgo (PLETT et al., 2010; FENG et al., 2011; GARNETT et al., 2013). Em cana-de-açúcar, foram identificados 45 membros da subfamília *NRT1/PTR* e 6 membros da subfamília *NRT2*, segundo Dr. Joni Esrom Lima[2].

NRT2;7 Flores

NRT1;3
NRT1;4
NRT1;6
NRT1;7 (floema) Parte aérea
NRT1;8 (xilema)
ClCa (vacúolo)
NRT1;1
NRT1;2
NRT1;5
NRT2;1 Raiz
NRT2;2
NAR2

Figura 3 - Representação esquemática da localização de expressão preferencial dos genes das subfamílias *NRT1* e *NRT2* em *Arabidopsis* (TSAY et al., 2007; GOJON et al., 2009).

[2] Informação fornecida por J. E. Lima no CENA/USP em Piracicaba, em 2014.

Em arabidopsis, o transportador de alta afinidade (*HATS*) *NRT2;1* apresenta expressão aumentada sob condições de déficit de N, sendo um dos principal responsáveis pela absorção de nitrato do solo (CEREZO et al., 2001). A localização na membrana plasmática e a estabilidade do transportador *NRT2;1* é dependente da proteína transmembrana NAR2 (WIRTH et al., 2007), sendo um indício do nível de regulação pós-transcricional para esse transportador. O principal transportador de nitrato é o *NRT1;1*, que possui dupla afinidade ao nitrato, apresentando alta afinidade (µM) ou baixa afinidade (mM) dependendo do estado de fosforilação da proteína (LIU; TSAY, 2003). Esse transportador foi caracterizado como sendo o sensor para o *status* de nitrato na raiz. Estudos em mutantes *nrt1;1* em arabidopsis demonstraram que a quinase de proteína CIPK23 fosforila o resíduo T101 do transportador *NRT1;1* regulando assim sua afinidade no transporte de nitrato (LIU; TSAY, 2003; HO et al., 2009). Além disso, *NRT1;1* é capaz de regular a expressão do transportador de alta afinidade *NRT2;1* (MUNÕS et al., 2004). Outra sinalização dependente de *NRT1;1* é o processo de alongamento de raízes laterais na presença de nitrato, que também é dependente do fator de transcrição ANR1 (ZHANG; FORDE, 2000). No mutante de arabidopsis *nrt1;1*, a resposta de alongamento das raízes laterais à exposição local de nitrato é perdida, o que sugere a participação desse transportador na sinalização de respostas morfológicas dependentes de nitrato (REMANS et al., 2006). A absorção líquida de nitrato em raízes é ainda regulada pelo efluxo dessa fonte de N. O controle de efluxo de nitrato em células do córtex da raiz foi atribuído à regulação do gene *NAXT1*, o qual é responsável pela excreção de nitrato induzida pela acidificação do pH citosólico (SEGONZAC et al., 2007). Fatores de transcrição *NLP7* e *NLP6* se mostraram importantes na resposta primária ao nitrato, já que regulam genes envolvidos no transporte e assimilação de nitrato, permitindo rápida adaptação a disponibilidade de nitrogênio para manter a homeostase de nitrato na planta (MARCHIVE et al., 2013; KONISHI; YANAGISAWA, 2013).

Além da aquisição das principais fontes inorgânicas de N do solo, o envolvimento dos transportadores de N é essencial na regulação da homeostase de amônio e nitrato nos diversos tecidos da planta. Uma vez dentro da célula, ambas as fontes de N podem ser assimiladas em aminoácidos e estocadas. Uma proporção significativa do nitrato geralmente é assimilada na parte aérea devido ao poder redutor gerado pelos tecidos fotossintetizantes, necessário para o processo de redução e assimilação do nitrato (GARNETT et al., 2009).

O transporte de nitrato da raiz para a parte aérea é dependente do carregador de xilema *NRT1;5*. Esse transportador pertence à família *NRT1*, cuja maioria dos membros são *LATS*. Estudos com o mutante para *NRT1;5* de arabidopsis revelaram que esse transportador é

responsável por exportar nitrato para fora das células do periciclo para ser subsequentemente carregado no xilema (LIN et al., 2008). Além desses transportadores, outros dois membros da família *NRT1* estão envolvidos no transporte de nitrato da raiz para a parte aérea. Análises referentes ao *NRT1;8* expresso em células parenquimais do xilema em raízes feitas com o mutante *nrt1;8* de arabidopsis sugerem que esse transportador atua na remoção do nitrato do xilema de volta para células das raízes (LI et al., 2010). A identificação do mutante no gene *NRT1;9* revelou que o transporte de nitrato via floema é menor (WANG; TSAY; 2011). O fenótipo de maior acúmulo de biomassa desse mutante submetido à alta concentração de nitrato indica um maior transporte de nitrato nesse mutante de arabidopsis, possivelmente via xilema. A localização desse transportador em células companheiras do floema, somada aos resultados obtidos sugerem uma função no transporte de nitrato via floema no sentido parte aérea-raiz. A regulação do transportador *NRT1;9* parece ser um importante mecanismo para evitar o excesso de nitrato em tecidos da parte aérea (WANG; TSAY, 2011).

A alocação de nitrato em tecidos vegetativos fotossintetizantes também é dependente de membros da família NRT1. A expressão do gene *NRT1;4* em pecíolos foliares revelou a função deste transportador na regulação da distribuição de nitrato em folhas (CHIU et al., 2004). A atuação de um transportador durante o processo de remobilização de nitrato de folhas maduras para folhas jovens foi indicada pelos altos níveis de expressão do transportador *NRT1;7* quando submetido a limitação de N em arabidopsis (KIBA et al., 2012). Esse transportador é expresso em células do floema, nas nervuras menores de folhas maduras. O mutante *nrt1;7* apresenta desenvolvimento retardado, e experimentos com aplicação de ^{15}N-nitrato demonstraram que o nitrato não pode ser transportado de folhas maduras para folhas jovens nesse mutante (KIBA et al., 2012). Esses resultados indicam que o carregamento do floema mediado por *NRT1;7* é essencial para o transporte no sentido de folhas fonte-dreno (KIBA et al., 2012).

Em arabidopsis foram identificados novos membros da família *NRT1*. Mutantes duplo dos genes *NRT1;11* e *NRT1;12* alcançaram maior concentração de ^{15}N em folhas maduras quando comparadas a tipo selvagem (ecotipo Col-0) em detrimento as folhas mais jovens. Este resultado sugere que ambas as proteínas de membrana estão envolvidos na transferência de nitrato via xilema-floema, afetando diretamente a redistribuição de nitrato para folhas em desenvolvimento e, portanto, o crescimento das plantas (HSU; TSAY, 2013).

O excesso de nitrato é estocado em vacúolos, o qual pode ser remobilizado a partir de folhas em condições de baixa disponibilidade de N. Para que isso ocorra, o nitrato deve ser

transportado através da membrana do tonoplasto, e posteriormente através da membrana plasmática das células do mesofilo, antes de ser carregado no floema (De ANGELI et al., 2006). O carregamento de nitrato em vacúolos é mediado pelos carreadores exportadores H^+/NO_3^-, *ClCa* e *ClCb*, localizados na membrana do tonoplasto (De ANGELI et al., 2006). Ambos os genes possuem regulação diurna e são induzidos pela aplicação exógena de nitrato (De ANGELI et al., 2006; VON DER FECHT-BARTENBACH et al., 2010).

Após o processo de absorção pela raiz, o nitrato é assimilado em amônio pela atividade da Nitrato Redutase (NR), que possui regulação tanto em nível de transcrição, quanto em nível de tradução (SCHEIBLE et al., 1997a; 1997b; MATT et al., 1998; TUCKER et al., 2004). A expressão do gene *NIA*, que codifica NR em tabaco, é induzida por nitrato e reprimida por glutamina (SCHEIBLE et al., 1997a; 1997b). Além disso, a expressão do gene *NIA*, bem como a atividade da NR, está sob o controle dos ritmos circadianos e da disponibilidade de açúcares, indicando a existência de uma correlação direta entre o metabolismo de N e de carbono (C) (SCHEIBLE et al., 1997; STITT et al., 2002; KRAPP et al., 2005).

Considerando a função fisiológica desses produtos gênicos é possível inferir que os diversos transportadores atuam de forma coordenada para manutenção da homeostase de nitrato em plantas (LEA; AZEVEDO, 2006). Apesar do considerável conhecimento gerado na compreensão dos processos de absorção e transporte de nitrato e sua regulação de acordo com o metabolismo de N em plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum* e *Oryza Sativa* (LI et al., 2006), pouco se conhece sobre os processos fisiológicos e moleculares dos processos de absorção e transporte de nitrato em plantas cultivadas (LEA; AZEVEDO, 2006; HIREL et al., 2007; XU et al., 2012).

Quando comparada a sorgo e milho, cana-de-açúcar possui menor eficiência na absorção e estoque de nitrato em seus tecidos, o que pode ser desvantajoso para o desenvolvimento dessa cultura em condições de cultivo em campo, levando ao aumento na perda de N no solo (ROBINSON et al., 2011). A maior habilidade em adquirir nitrato pelas plantas pode trazer vantagens adaptativas. Além de nutriente essencial, nitrato também desencadeia respostas para regulação de processos de desenvolvimento em plantas. Em arabidopsis e milho, a suplementação com nitrato leva ao aumento significativo dos níveis de citocininas no xilema, estando correlacionado diretamente com o *status* nutricional da planta (TAKEI et al., 2001; 2004). Tal processo ocorre devido à indução do gene *IPT3* (*ADENOSINA FOSFATO ISOPENTINILTRANSFERASE3*), que faz parte da via de biossíntese de citocininas (TAKEI et al., 2004). O nitrato também atua na sinalização para

controle local do desenvolvimento radicular, levando ao aumento na ramificação de raízes laterais (REMANS et al., 2006; LIMA et al., 2010), que pode favorecer a aquisição de nutrientes e água. Portanto, a nutrição por nitrato pode desencadear a regulação/reprogramação do desenvolvimento da expansão da parte aérea e o desenvolvimento radicular.

Apesar de ser a fonte de N inorgânica mais abundante encontrada em solos agricultáveis, devido a sua forma aniônica o nitrato é facilmente dissolvido na solução do solo, apresentando alta mobilidade e estando sujeito ao processo de lixiviação (MARSCHNER, 1995). No solo, a concentração de nitrato pode ser de 10 a 20 vezes maior do que a concentração de amônio, dependendo da atividade microbiana, pH, concentração de oxigênio e temperatura (MILLER et al., 2007). Assim, a disponibilidade de nitrato nos solos pode variar de forma considerável, o que requer o uso de estratégias de adaptação da planta para lidar com as flutuações de concentração dessa forma inorgânica de N no solo. Em solos com cultivo de cana-de-açúcar, a concentração de nitrato apresenta perfil diverso ao longo do ciclo dessa gramínea. A análise de composição de N em solos de cultivo de cana na Austrália demonstrou que, no início do ciclo, logo após a fertilização por N (uréia), as concentrações de nitrato e amônio são similares (ROBINSON et al., 2011). Contrariamente ao esperado, nos dois meses subsequentes ao início do cultivo, a concentração de nitrato foi 2,5 vezes maior que a concentração de amônio no solo, atingindo a faixa de milimolar. Porém, ocorre um significativo decréscimo na concentração de nitrato nos meses seguintes, podendo atingir concentrações na faixa de micromolar, devido ao aumento nas taxas de nitrificação (ROBINSON et al., 2011). Esses resultados exemplificam a variação da disponibilidade de nitrato em solos cultivados com cana-de-açúcar, indicando que durante o ciclo dessa cultura, a aquisição de nitrato pode também variar de acordo com a disponibilidade dessa forma inorgânica de N. Além deste aspecto, amônio é a fonte preferencial de N para cana-de-açúcar em condições de suficiência de N comparado a nitrato (ROBINSON et al., 2011). As causas fisiológicas e moleculares dessa reduzida eficiência no uso de nitrato em cana-de-açúcar ainda permanecem por ser elucidadas.

Portanto, entender os mecanismos de regulação do processo de aquisição de nitrato de acordo com a variação de N no solo é fundamental para a compreensão do processo da reduzida capacidade de absorção de nitrato nas raízes da cana-de-açúcar. Considerando esses aspectos, a presente dissertação objetivou inicialmente caracterizar o processo de absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar. Estudos de cinética de absorção com ^{15}N-nitrato em

raízes foram empregados para caracterizar a regulação do influxo/absorção de acordo com o status de N da planta e o tipo de fonte inorgânica de N (amônio e nitrato) disponível. Posteriormente, o processo de transporte de nitrato na parte aérea foi caracterizado de acordo com a disponibilidade de N para a planta. Após a caracterização fisiológica dos processos de absorção e transporte de nitrato nos diversos tecidos, estudos do perfil transcricional de genes relacionados a absorção e remobilização de nitrato foram realizados em raízes e parte aérea de cana-de-açúcar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e micropropagação

Foi utilizada a cultivar 'SP80-3280' em todos os ensaios, pois foi a empregada no projeto de transcritoma da cana-de-açúcar (*Sugarcane EST Project, SUCEST*,). As cultivares 'IAC87-3396' e 'IACSP96-2042', distintas quanto ao uso eficiente de N (Comunicação Pessoal, Dr. Joni Esrom Lima[3]) foram empregadas em um experimento realizado para investigar a presença de um mecanismo de regulação pós-transcricional no processo de aquisição de nitrato em plantas ressuplementadas com esta fonte de N.

As plântulas de 'SP80-3280' foram obtidas por meio de cultura *in vitro* de ápices oriundos de plantas da coleção de germoplasma no CENA/USP. A micropropagação foi conduzida segundo o protocolo descrito por Lee (1987). Gemas nodais retiradas de plantas adultas foram esterilizadas em solução de 5-10% de desinfetante comercial (produto comercial contém 2-2,5% de hipoclorito de sódio) por 40 min, e em seguida, foram lavadas em água destilada e plantadas em caixas contendo vermiculita (Terra Mater). Quando as plântulas brotadas atingiram um tamanho de cerca de 25 cm, o ápice foi retirado, esterilizado em álcool 70% por 1 min, seguido de desinfecção conforme descrito acima por 20 min, lavado três vezes em água estéril, dissecado e introduzido em meio *in vitro* (Figura 4A; LEE, 1987).

[3] Informação fornecida por J. E. Lima no CENA/USP em Piracicaba, em 2014.

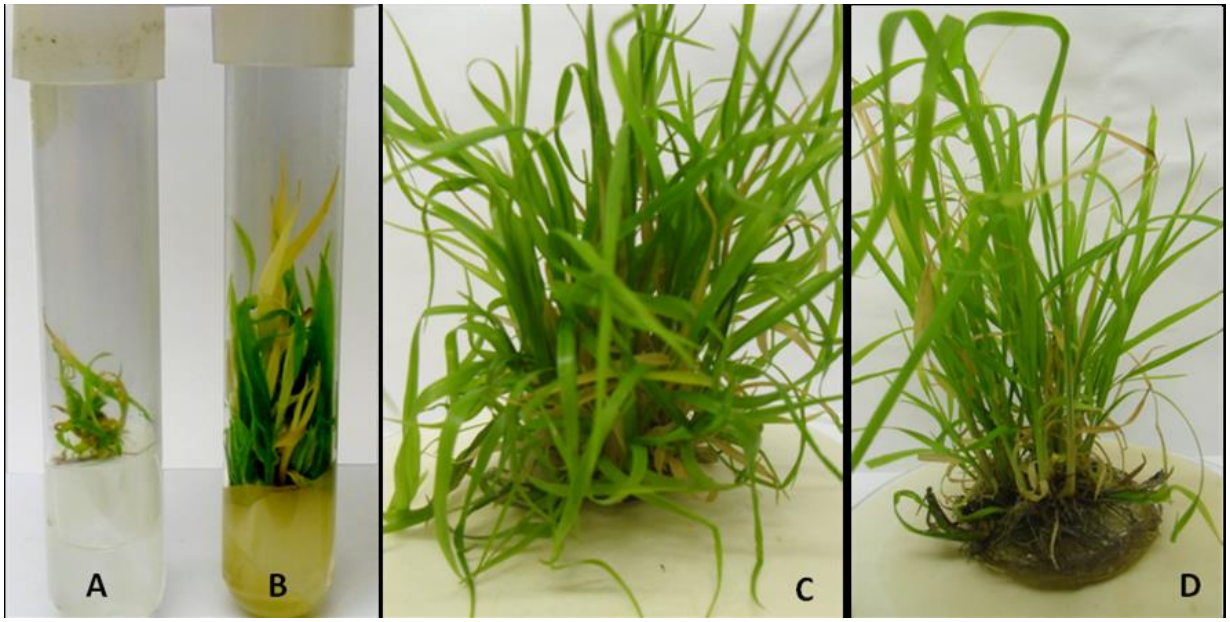


Figura 4 - Micropropagação das plantas de cana-de-açúcar (‘SP80-3280’). A- Ápice caulinar 15 dias após introdução *in vitro*; B- Plântulas micropropagadas em meio MP II 30 dias após introdução *in vitro*; C Plântula com 45-50 dias após introdução, com sucessivas trocas de meio MP II; D- Plântulas com 60-70 dias após introdução, já em meio de enraizamento MR.

O meio utilizado para multiplicação foi o MP II (sais MS; 20 g L^{-1} de sucrose; 100 mg L^{-1} de mio-inositol; 1 mg L^{-1} de tiamina-HCl; 0,1 mg L^{-1} de kinetina; 0,2 mg L^{-1} de benzil-aminopurina – BAP; com pH ajustado para 5,8 antes da autoclavagem) (Figura 4B e C). Após dois meses de crescimento sob fotoperíodo de 16:8h a 25° C, as plântulas foram transferidas para o meio de enraizamento MR (sais de MS, Tabela 1; 40 g L^{-1} de sucrose; 63 mL L^{-1} de macronutrientes; 5 mL L^{-1} de micronutrientes e 10 mL L^{-1} de Fe-EDTA; com pH ajustado para 4,8 antes de autoclavagem) por cerca de duas semanas (Figura 4D). Na tabela abaixo está descrito os sais e as concentrações utilizadas para o preparo das soluções estoques de sais de MS.

Tabela 1 – Sais utilizados, e suas respectivas concentrações, para o preparo das soluções estoques de sais MS

Soluções	Sais	Concentração (g/L)
Macronutrientes	$CaCl_2.2H_2O$	7,04
	KH_2PO_4	2,72
	NH_4NO_3	26,4
	KNO_3	30,4
	$MgSO_4.7H_2O$	5,92
Micronutrientes	$MnSO_4.H_2O$	3,38
	$ZnSO_4.7H_2O$	1,72
	H_3BO_3	1,24
	$NiSO_4.5H_2O$	0,0104
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,05
	$CuSO_4.5H_2O$	0,005
	$CoCl_2.6H_2O$	0,005
Fe-EDTA	Na_2EDTA	3,72
	$FeSO_4.7H2O$	2,78

O material de ‘IAC87-3396’ e ‘IACSP96-2042’ foram gentilmente cedidas pelo Dr. Silvana Creste, pesquisadora do “Centro de Cana” do Instituto Agronômico de Campinas, como plântulas enraizadas *in vitro*. Em seguida, as plantas foram aclimatizadas por duas semanas em caixas de 5 L contendo 1/4 da concentração de sais da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) (Anexo A), sendo posteriormente transferidas para recipientes plásticos com capacidade para 25 L contendo a mesma solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950; SERENO et al., 2007). O controle automático de temperatura do ar circulado e aeração a cada 15 min mantiveram as plantas nas condições adequadas em casa de vegetação. Tanques contendo 300 L de solução nutritiva conectados aos vasos, com duas plantas cada, suplementaram todo o sistema por 24 h (Figura 5).

Figura 5 - Sistema de hidroponia utilizado para o crescimento e realização dos experimentos.

3.2 Estudos da cinética de absorção de nitrogênio pela raiz por influxo rápido de ^{15}N

Para os estudos da cinética de absorção de nitrogênio pela raiz de plantas *in vivo* descritos abaixo como dependente da fonte ou do status de N da planta, foram realizados ensaios de influxo rápido de ^{15}N (*Short Term Uptake*; LOQUÉ et al., 2006). Para se estimar o influxo rápido, primeiramente, as raízes de cana-de-açúcar foram lavadas em solução de 1 mM $CaSO_4$ (sulfato de cálcio) com o intuito de eliminar N apoplástico. Em seguida, as plântulas foram colocadas em 1,3 L de solução hidropônica, contendo 0,2 mM de ^{15}N marcado e 1 mM de MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico monohidratado) pH 5,8 por um período de 10 mim, seguido por 1 min em solução de 1 mM $CaSO_4$ para a lavagem das raízes (LOQUÉ et al., 2006).

No experimento realizado *in vitro*, plântulas dos genótipos ‘IAC87-3396’, ‘IACSP96-2042’ e ‘SP80-3280’ foram cultivadas em condição constante de suficiência de N (2 mM de NH_4NO_3) em meio de enraizamento MR (sais de MS, Tabela 1; 40 g L^{-1} de sucrose; 63 mL L^{-1} de macronutrientes; 5 mL L^{-1} de micronutrientes e 10 mL L^{-1} de Fe-EDTA; com pH ajustado para 4,8 antes de autoclavagem). Após esse período, as plantas foram transferidas para soluções de meio MR líquido contendo $K^{15}NO_3$ (98,18% em átomos de ^{15}N) por um período de 10 min, seguido por 1 min em solução de 1 mM $CaSO_4$ para a lavagem das raízes (LOQUÉ et al., 2006).

As amostras de raízes foram então coletadas, secas, moídas e analisadas no espectrômetro de massas de ionização por impacto de elétrons IRMS (ANCA GSL 20/20 ou ANCA SL da Sercon, Inglaterra), no laboratório de Isótopos Estáveis, CENA, pelo Prof. Dr. José Albertino Bendassolli.

Na intenção de identificar a fonte preferencial de N por cana-de-açúcar, e a regulação do processo de absorção pelo *status* deste nutriente na planta, foi realizado ensaio empregando fontes de N-marcado na faixa de concentração de ativação do sistema de absorção de alta-afinidade (0,2 mM de ^{15}N). Plantas de cana-de-açúcar da cultivar ‘SP80-3280’foram crescidas por três meses em condições de suficiência de N, quando foram submetidas a tratamento de suficiência (+N; 2 mM de NH_4NO_3) ou deficiência de N (-N) por três dias. Em seguida, estudos de cinética de absorção com ^{15}N-nitrato (0,2 mM de $K^{15}NO_3$ a 40% em átomos de ^{15}N) e ^{15}N-amônio [0,1 mM de $(NH_4)_2SO_4$ a 40% em átomos de ^{15}N] foram realizados em solução nutritiva. Foram coletadas 4 ou 5 réplicas biológicas para cada tratamento.

Para a caracterização do processo de indução do transporte de nitrato pela deficiência de N, plantas crescidas em suficiência de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram transferidas para solução nutritiva sem N (-N) por 0, 1, 3, 6, 24 e 72 h, quando foram analisadas por influxo rápido (0,2 mM $K^{15}NO_3$ a 40% em átomos de ^{15}N). Foram utilizadas 4 ou 5 réplicas biológicas em cada tempo amostrado.

O terceiro ensaio visou avaliar se existe regulação da fonte de N inorgânica sobre a reduzida capacidade de aquisição de nitrato pelas raízes de cana-de-açúcar (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Plantas de três meses crescidas em solução nutritiva (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram submetidas a tratamento com 4 mM de nitrato (KNO_3) ou 4 mM de amônio (NH_4Cl). Após esse tratamento, as plantas foram analisadas quanto ao influxo de ^{15}N (0,2 mM de $K^{15}NO_3$ a 40% de átomos de ^{15}N) nos tempos 0, 2, 6, 24, e 72 h após o

tratamento. Para esse experimento, foram utilizadas de 4 a 5 réplicas biológicas por cada tempo amostrado.

O quarto ensaio foi realizado para a caracterização da regulação do transporte de nitrato pela raiz de acordo com a presença dessa fonte de N. Neste experimento de provisão, plantas cultivadas por três meses em solução nutritiva (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram submetidas a limitação de N (-N) por 72 h. Após esse período, as plantas foram colocadas em presença de nitrato (4 mM KNO_3), sendo analisado o influxo rápido de ^{15}N-nitrato (0,2 mM de $K^{15}NO_3$ a 40% de átomos de ^{15}N), 0, 2, 4 e 24 h após provisão de tal fonte de N. Foram utilizadas de 4 a 5 réplicas biológicas em cada tempo amostrado.

Visando a melhor compreensão do processo de aquisição de nitrato em raízes após provisão de nitrato, foi realizado um quinto experimento com os genótipos 'IAC87-3396' e 'IACSP96-2042', distintos quanto ao uso eficiente de N (Dr. Joni Esrom Lima - Informação verbal[4]), e também com a cultivar 'SP80-3280'. Para isso, os três genótipos foram cultivados em condições ótimas de suficiência de N (+N, 2 mM NH_4NO_3), sendo posteriormente submetidas a baixo N (0,2 mM de nitrato) por 7 dias. Após esse período, os três genótipos foram submetidos a tratamento com altas concentrações de nitrato de amônio, alto N (5 mM NH_4NO_3). As análises de influxo rápido de ^{15}N-nitrato na faixa de alta-afinidade (0,2 mM de $K^{15}NO_3$ a 98,18% em átomos de ^{15}N) foram realizadas nos tempos 0 h (plantas em baixo N; 0,2 mM de nitrato), 4 h e 24 h após a imposição do tratamento de para alto N (5 mM NH_4NO_3). Foram coletadas de 5 a 6 réplicas biológicas em cada tempo amostrado.

Em todos estes ensaios descritos anteriormente, amostras de raízes de cana-de-açúcar foram coletadas em triplicata, congeladas e utilizadas para extração de RNA total para analisar quantitativamente os transcritos reversos (RT-qPCR) dos genes identificados em cana-de-açúcar responsáveis pelo processo de aquisição de nitrato (*NRT - NITRATE TRANSPORTERS*).

3.3 Estudos de remobilização de nitrogênio

Com a intenção de caracterizar o processo de transporte de nitrato na parte aérea de cana-de-açúcar, foi realizado um experimento de translocação/remobilização de ^{15}N-NO_3 *in vivo* (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010; MASCLAUX-DAUBRESSE; CHARDON,

[4] Informação fornecida por J. E. Lima no CENA/USP em Piracicaba, em 2014.

2011). Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram divididas em 2 tratamentos. Um grupo de plantas foi colocado em solução contendo 0,5 mM NH_4NO_3, fornecido como $^{15}NH_4NO_3$ (20% de átomos de ^{15}N) por 48 h, enquanto o outro grupo foi colocado em solução contendo 0,5 mM NH_4NO_3, fornecido como $NH_4{}^{15}NO_3$ (20% de átomos de ^{15}N) por 48 h. Após esta etapa, as plantas foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3), sendo que para cada tratamento amostras de raízes, colmo, folhas madura (+3) e folhas recém expandidas (+1) foram analisadas nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d após o tratamento com N-marcado com o objetivo de avaliar o fluxo de derivados de ^{15}N em condições contrastantes de disponibilidade de N. Amostras dos mesmos tecidos vegetais foram coletadas em triplicata nos tratamentos e tempos descritos, congeladas e utilizadas para extração de RNA total para quantificar os transcritos reversos dos transportadores envolvidos nos processo de aquisição e remobilização de nitrato.

3.4 Extração de RNA e síntese de cDNA

Para análise de expressão gênica, amostras de raiz dos experimentos de cinética de absorção de nitrato, bem como raiz e parte-aérea do experimento de remobilização, foram coletadas em triplicatas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA. Tal extração foi feita utilizando o método descrito em Leal et al. (2007). Brevemente, as amostras foram maceradas em N líquido e transferidas para um microtubo de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL de tampão de extração pré-aquecido à 65°C (2 % CTAB; 2% PVP; 2 M NaCl; 100 mM Tris; 25 mM EDTA; 2% ß-mercaptoethanol). Após a homogeneização em banho-maria à 65°C por cerca de 30 min, as amostras foram colocadas no gelo por 1 min, seguida da adição de 1 mL de CIA (clorofórmio:álcool-isoamílico 24:1) e de uma centrifugação a 9.000 *g* por 10 min a 4° C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, adicionando um volume igual de CIA, que foi emulsionado seguido de uma centrifugação a 9.000 *g* por 10 min a 4^oC. Novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL para posterior precipitação do RNA total, com solução de 10 M de LiCl (0,1 vol) e incubação a 4^oC por 12 h. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 9.000 *g* por 30 min a 4° C, seguido do descarte do sobrenadante. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500 µL de 75% etanol (etanol: H_20 DEPC inativa 3:1) e centrifugado a 9.000 *g* por 10 min a 4° C. Por fim, foi feita a ressuspensão do *pellet* em 30 µL de água 0,01% DEPC inativa. O RNA foi quantificado em NanoDrop e sua integridade confirmada via eletroforese.

Após a quantificação, cerca de 2 µg do RNA de cada amostra foi tratado empregando 1 U de DNAse I (Invitrogen; Carlsbad, CA, EUA) em tampão apropriado, 2 U de RNAseout (Invitrogen) e água ultrapura DEPC inativa, em reação incubada a 37ºC por 30 min. A reação foi parada com a adição de EDTA, e incubada a 65ºC por 10 min. Amostras de 1 µg de RNA total tratado e o oligodT (0,5 µg μL^{-1}) foram desnaturadas a 70°C por 10 min e incubadas a 4°C por 2 min, seguido da adição de 4 µL de 5X First-Strand Buffer, 1 mM dNTP, 40 U de RNAseOUT (Invitrogen), 1 µL de DTT 0,1 M e 20 U da enzima SuperScript III RT (Invitrogen). A reação foi então incubada a 55° C por 1 h, seguida de incubação a 70º C por 10 min e 4° C por 2 min.

3.5 Identificação de genes da família *NRT/PRT (NITRATE TRANSPORTERS/ PEPTIDE TRANSPORTERS)*

Para identificação dos genes ortólogos aos transportadores de nitrato (família *NRT/PRT*), sequências de arabidopsis e arroz foram utilizadas na busca de ESTs presentes no banco de dados do SUCEST (*Sugarcane Expressed Sequence Tag*). Sequências de aminoácidos de genes ortólogos foram obtidas pelo Dr. Joni Esrom Lima (Lab. Melhoramento de plantas, CENA/USP) e Prof. Dr. Renato Vicentini (Lab. Bioinformática e Biologia de Sistemas, UNICAMP).

3.6 Desenho de iniciadores para genes da família *NRT/PRT* (*NITRATE TRANSPORTERS/ PEPTIDE TRANSPORTERS*)

Os iniciadores específicos para cada gene foram desenhados com base nos *Tentative Consensus* (TCs) do bando de dados do SUCEST relativos a genes que codificam proteínas dos genes ortólogos da família de transportadores de nitrato (*NRTs- NITRATE TRANSPORTER*) de cana-de-açúcar (Tabela 2), utilizando-se o programa *Primer3* (http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/), designando-se a temperatura de dissociação (T_m) de 61 ^{o}C, e o tamanho de amplicons entre 80 a 250 pb. O par de iniciadores de cada gene foi testado no programa *NetPrimer* para estabilidade, Tm, conteúdo de GC (%) e interações entre iniciadores.

Tabela 2 - Sequências de iniciadores (*primers*) relativos aos genes que codificam proteínas transportadoras (*NRTs-NITRATE TRANSPORTERS*), responsáveis na absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar, e o gene referência empregado (Ubiquitina2), com seus respectivos tamanhos esperado do amplicons, utilizados para análise quantitativa de transcritos reversos.

Nome	Sequência dos *primers*	Amplicon
ScNRT1.1 For	CCTGGTGACGTACCTGATGG	128 pb
ScNRT1.1 Rev	ACGATGTAGATGGTGTAGGTGGTG	
ScNRT2.1 For	GAGCATCCGTCTCTTCTCCTTC	144 pb
ScNRT2.1 Rev	GCCTTGGTGAGGTTGAGGTT	
ScNAR2.1 For	GCTGGCGGTGCTTCTCTT	174 pb
ScNAR2.1 Rev	GGCTCGGTGGTGTTCAGG	
ScNRT2.5 For	ATCGTGCCGTTCGTCTCC	131 pb
ScNRT2.5 Rev	ATCCCCGTCTCCGTCTTGT	
ScNRT1.4 For	TTCCTCTCCGACGCCTAC	228 pb
ScNRT1.4 Rev	ATGAAGAGCACCGCGAACT	
ScNRT1.5 For	GCAATACTGAGCGGATGGTT	165 pb
ScNRT1.5 Rev	CATGTGCTACAAGGGCATCAAG	
Ubiquitina2 For	CTTCTTCTGTCCCTCCGATG	159 pb
Ubiquitina2 Rev	TCCAACCAAACTGCTGCTC	

3.7 Análise de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR)

As reações continham 5 µL de KAPA SYBR FAST (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, EUA), 0,2 µM de cada iniciador, 1 µL do cDNA 3:7 (v/v) e água Milli-Q estéril para um volume final de reação de 10 µL. A análise de RTqPCR dos genes *ScNRT* incluíram nos experimentos um controle negativo (sem cDNA) e foram realizadas no RotorGene-6000 (Qiagen; Hilden, Alemanha). O perfil da reação foi designado com duas temperaturas iniciais: 50° C por 10 min e 95° C por 2 min, seguidos de 40 ciclos de três passos: 95° C por 20 s, 60/62º C por 25 s e 72° C por 25 s. Após a amplificação, determinou-se a curva de dissociação entre 72 e 95°C. Em todos os experimentos os valores dos C_Q (*quantification cycle*) foram utilizados para determinar a diferença da expressão gênica, de acordo com método "Delta Delta" (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001): razão $=2^{-\Delta(\Delta Cq)}$ sendo $\Delta C_Q = C_Q$ (gene alvo) – C_Q (gene referência) e o $\Delta = \Delta C_Q$ (tratamento) - ΔC_Q (controle). Para todos os experimentos o gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do processo de absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar

A eficiência na aquisição de N pelas raízes a partir do solo consiste num dos processos essenciais para o uso eficiente do nitrogênio (NUE). Essa eficiência na absorção de N depende do transporte de nitrato e amônio em nível de raiz (LEA; AZEVEDO, 2006; KROUK et al., 2010). Em geral, a regulação do transporte de um nutriente é determinada pela absorção do mesmo em condições de alta ou baixa disponibilidade (MARSCHNER, 2012). No caso do N, o sistema de transporte de íons pela membrana plasmática de células radiculares, bem como o sistema metabólico responsável pela assimilação desse nutriente nas células, são ambos reprimidos de acordo com o aumento da concentração de N no solo (GLASS et al., 2002; LOQUÉ; von WIRÉN, 2004). Trabalhos clássicos correlacionando o influxo de N e acúmulo dos íons nitrato e amônio demonstraram que o nitrato e o produto de sua redução - o nitrito - são capazes de induzir o sistema de influxo de nitrato em raízes de diferentes espécies (TOMPKINS et al., 1978; SIDDIQI et al., 1992; HENRIKSENZ; SPANSWICK, 1993). No entanto, à medida que células radiculares absorvem e acumulam N, o influxo de nitrato e amônio é reprimido (SIDDIQI et al., 1989; KRONZUCKER et al., 1995b; FORDE; CLARKSON, 1999). Tal repressão demonstra que o acúmulo de produtos da assimilação de N, como glutamina, exerce um *feedback* negativo na absorção de N inorgânico (SIDDIQI et al., 1989). Experimentos realizados em raízes de arroz e milho utilizando inibidor de atividade da enzima GS- Glutamina sintetase, responsável pela assimilação de amônio, levaram ao estímulo na absorção de amônio nessas espécies, contrariamente ao que foi observado em sorgo (FENG et al., 1994; GLASS et al., 1997; SONODA et al., 2003), indicando que o N *per se* pode influenciar na regulação dos processos de absorção e assimilação desse nutriente.

Com o avanço da identificação dos genes responsáveis pela absorção de fontes inorgânicas de N em plantas (LOQUÉ; von WIRÉN 2004), o número crescente de evidências demonstra que nitrato e amônio, além de serem nutrientes essenciais, atuam como sinalizadores em plantas, regulando não somente genes responsáveis pela sua aquisição, mas também genes responsáveis pela sua assimilação (LANQUAR et al., 2009; WANG et al., 2009; KROUK et al., 2010).

Considerando que diversas espécies vegetais utilizam distintas estratégias adaptativas em resposta às flutuações de disponibilidade de N no solo, no presente trabalho foram realizados estudos de cinética de absorção, identificação e análise da expressão dos genes responsáveis pela aquisição de nitrato, a fim de investigar a regulação do processo de aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar.

4.1.1. Eficiência na absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar

Apesar da importância do N como nutriente limitante do crescimento e produtividade das culturas agrícolas, poucos estudos foram realizados com o objetivo de definir claramente a preferência da fonte inorgânica de N em diversas espécies (BOUDSOCQ et al., 2012). Experimentos utilizando concentrações equimolares de nitrato ou amônio marcados em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em campo demonstraram que o amônio é a fonte preferencial de N quando comparado a nitrato, em condições de suficiência de N; porém esta preferência por amônio não foi confirmada quando N era limitante no solo (ROBINSON et al., 2011).

Inicialmente, com o objetivo de confirmar a preferência por amônio em detrimento da absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar, estudos de influxo rápido de nitrato ou amônio marcado (*Short-Term Uptake;* LOQUÉ et al., 2006) foram realizados para a caracterização fisiológica do processo de absorção dessas fontes inorgânicas de N em condições contrastantes de disponibilidade desse nutriente.

Considerando a importância da regulação do sistema de absorção de alta-afinidade (HATS) em condições de cultivo em campo (MALAGOLI et al., 2004), e que o sistema de baixa afinidade de absorção (LATS) de N é dependente da atividade de HATS (WANG et al., 1993a; 1993b), o presente estudo foi realizado empregando fontes de N-marcado na faixa de concentração de ativação do sistema de absorção de alta-afinidade (0,2 mM de ^{15}N). Plantas de cana-de-açúcar da cultivar ‘SP80-3280’foram crescidas por três meses em condições de suficiência de N, quando foram submetidas a tratamento de suficiência (+N; 2 mM de NH_4NO_3) ou deficiência de N (-N) por três dias e em seguida estudos de cinética de absorção com N marcado (^{15}N-nitrato e ^{15}N-amônio) foram realizados em solução nutritiva.

Análises de influxo rápido de ^{15}N-amônio em raízes demonstraram que plantas submetidas à deficiência de N (-N) apresentaram aproximadamente 2,25 vezes maior absorção de amônio (108,05 μmol h^{-1} g^{-1} MS) em comparação a plantas sob suficiência de N (48,22 μmol h^{-1} g^{-1} MS), o que indica a indução no processo de aquisição de amônio em raízes de cana-de-açúcar quando a disponibilidade de N exógeno é limitante (Figura 6). Indução semelhante foi observada no processo de aquisição de nitrato em plantas cultivadas em condição limitante de N (-N), nas quais o influxo de ^{15}N-nitrato foi aproximadamente 4,9 vezes maior (5,05 μmol h^{-1} g^{-1} MS) quando comparado às plantas submetidas à suficiência de N (1,03 μmol h^{-1} g^{-1} MS), evidenciando assim a regulação da absorção de nitrato de acordo com o status de N (Figura 6). Esses resultados demonstram que plantas de cana-de-açúcar possuem sistema de absorção HATS para nitrato e amônio presentes nas raízes, que são induzidos quando as concentrações externas de N são baixas e/ou o status de N na planta diminui (Figura 6). Logo, o sistema de HATS para absorção de nitrato nas raízes parece ser importante para a regulação da demanda de N em cana-de-açúcar, agindo na aquisição de N quando cultivada em baixas concentrações de N no solo. Similar mecanismo foi previamente identificado em outras espécies (LEE; RUDGE, 1986; WANG et al., 1993a; 1993b; KRONZUCKER et al., 1998; LEJAY et al., 1999; VON WIREN et al., 2000).

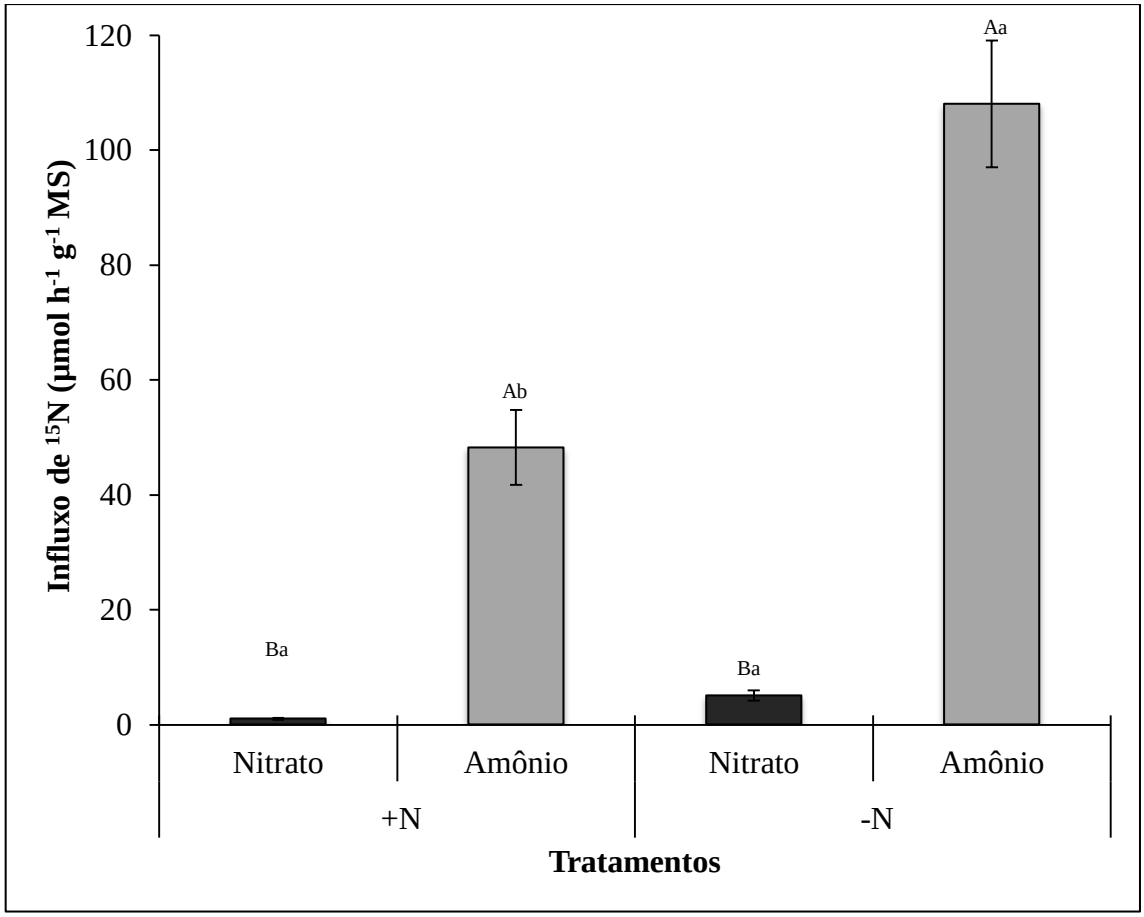


Figura 6 - Influxo de $^{15}N\text{-}NO_3^-$ ou $^{15}N\text{-}NH_4^+$ em raízes de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas cultivadas em solução nutritiva com condições suficientes de N (+N; 2 mM NH_4NO_3) foram submetidas a tratamento sem adição de N (-N) ou com suficiência de N (2 mM NH_4NO_3) por 3 dias. Estudos de absorção com ^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amonio na concentração de 0,2 mM de N total foram realizados em plantas de cana-de-açúcar da cultivar 'SP80-3280'. Letras maiúsculas comparam as médias entre influxos de nitrato e amônio marcados dentro de cada tratamento de N (+N e –N). Letras minúsculas comparam independentemente nitrato e amônio dentro de cada tratamento de N (+N e –N). Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente pelo teste Scott-Knott a 5%, *n*= 4.

A comparação direta do processo de aquisição entre as fontes inorgânicas de N indica que sob suficiência de N, a absorção de nitrato é 98% menor que a absorção de amônio (Figura 6). Tal diferença também é evidente quando N é limitante, quando o influxo de ^{15}N-nitrato é 95% menor que o influxo de ^{15}N-amônio (Figura 6). Esses resultados corroboram a menor eficiência da cana-de-açúcar na aquisição de nitrato quando comparada com a aquisição de amônio em condições suficientes de disponibilidade de N (ROBINSON et al., 2011) (Figura 6). No entanto, a cultivar 'SP80-3280' também apresentou menor aquisição de nitrato quando N é limitante (Figura 6), o que diverge de Robinson et al.,(2011), que concluiu

que a cana-de-açúcar sob restrição de N não apresenta preferência pela fonte de N. Os resultados aqui apresentados demonstram que mesmo sob deficiência de N, a aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar é reduzida quando comparado a amônio (Figura 6).

Essa diferença poderia ser devido a cultivar utilizada, condições de cultivo ou ainda, devido ao tipo de análise da aquisição de ^{15}N realizada. Em relação a cultivar, experimentos realizados no laboratório de Melhoramento de Plantas com outros genótipos de cana-de-açúcar apresentaram resultados similares para preferência da fonte inorgânica de N sob deficiência deste nutriente, segundo Dr. Joni Esrom Lima (Informação verbal)[5]. A comparação direta entre cultivo em condições de campo e plantas em solução nutritiva em casa de vegetação, por sua vez, pode levar a essa diferença de resultados, sendo que em condições de campo, a indução de HATS quando sob limitação de N é mais difícil de ocorrer quando comparada ao cultivo em solução nutritiva (ROBINSON et al., 2011). Portanto, é possível especular que a indução de HATS para amônio pode ter sido menor que a indução de HATS para nitrato. Ainda, Robinson et al. (2011) descreve que os experimentos foram realizados em raízes escavadas em plantas cultivadas em campo que foram expostas a uma solução enriquecida de ^{15}N por 30 ou 120 min, sendo posteriormente coletadas as raízes para análise de concentração de ^{15}N. Nesse caso, este método de exposição à solução de ^{15}N utilizado por 30 e 120 min reflete a cinética de transporte envolvendo influxo e efluxo, que estima num valor líquido de absorção (do inglês *net uptake*), por ser avaliada após um longo período de exposição à fonte de N-marcado (que no caso do N é relevante), principalmente quando este está disponível em altas concentrações, sendo, portanto, um método de menor precisão de medição (BRITTO et al., 2006; SZCZERBA et al., 2008; LI et al., 2010).

No presente trabalho, os estudos de absorção de N pela raiz foram realizados num período curto de exposição de ^{15}N, o que permite estimar neste caso, apenas o influxo de N unidirecional através da membrana celular. Esse tipo de ensaio, denominado de *Short Term Uptake*, foi descrito para outras espécies como tomate, arabidopsis e arroz (GAZZARRINI et al., 1999; KRONZUCKER et al., 2000; LOQUÉ et al., 2006; YUAN et al., 2007). Portanto, a metodologia de influxo pode ter levado a diferenças entre os resultados aqui apresentados e aqueles de Robinson et al., (2011). Apesar dessa diferença, a baixa eficiência na absorção de nitrato, em comparação com a absorção de amônio, é evidente (Figura 6) (ROBINSON et al., 2011).

[5] Informação fornecida por J. E. Lima no CENA/USP em Piracicaba, em 2014.

Como determinado pelos experimentos realizados, a cana-de-açúcar possui menor eficiência na absorção de nitrato em suas raízes, o que difere de outras importantes culturas como sorgo e milho, que possuem maior preferência pela aquisição de nitrato em detrimento do amônio (ROBINSON et al., 2011). Gramíneas mais próximas da cana-de-açúcar, como *Andropogon gayanus* e ainda mais distantes, como *Brachiaria* também adquirem preferencialmente amônio comparado a nitrato (ROSSITER-RACHOR et al., 2009; SUBBARAO et al., 2009). No entanto, as causas fisiológicas e moleculares dessa menor eficiência na aquisição de nitrato ainda permanecem desconhecidas. Para melhor compreensão da regulação do processo de aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar, foram realizados estudos de influxo visando identificar a(s) possível(is) causa(s) dessa menor capacidade de aquisição de nitrato, e suas potenciais aplicações para melhoria na NUE de cana.

4.1.2. Regulação do transporte de nitrato em raízes de cana-de-açúcar submetidas à deficiência de nitrogênio

Nitrato é a fonte de N inorgânica mais abundante encontrada em solos agricultáveis, mas devido a sua forma aniônica é facilmente dissolvido na solução do solo, apresentando alta mobilidade e estando sujeito ao processo de lixiviação (MARSCHNER, 1995; MILLER et al., 2007). Estudos de composição de N em solos de canaviais realizados por ROBINSON et al. (2011) demonstraram que, apesar da alta concentração de nitrato (faixa de milimolar) nos dois primeiros meses de cultivo, houve significativo decréscimo devido ao aumento nas taxas de nitrificação, resultando em concentrações desta fonte de N na faixa de micromolar. Tais resultados mostram que a aquisição de nitrato também varia de acordo com a sua disponibilidade no solo. Assim, entender a regulação do processo de aquisição de nitrato de acordo com a variação de N no solo é fundamental para compreender a causa da reduzida capacidade de absorção de nitrato nas raízes da cana-de-açúcar.

Quando N é limitante em solos cultivados, as plantas em geral utilizam a estratégia de adaptação, aumentando a aquisição de nitrato em raízes por meio da regulação do HATS de acordo com a demanda de N da planta (Figura 6) (SIDDIQI et al., 1990; WANG et al., 1993a; 1993b; FORDE; CLARKSON 1999; FRAISIER et al., 2000; CEREZO et al., 2001; KROUK et al., 2006). Com o objetivo de caracterizar esse processo de indução do transporte de nitrato pela deficiência de N em raízes de cana-de-açúcar, plantas cultivadas em suficiência de N

(N+; 2 mM de NH_4NO_3) por 3 meses foram transferidas para solução nutritiva com limitação de N (-N). Em seguida, estudos de influxo rápido de ^{15}N foram conduzidos nos tempos de 0, 1, 3, 6, 24 e 72 h após a imposição do tratamento de restrição de N.

Em relação a plantas cultivadas sob suficiência de N (+N), a limitação de N (-N) regulou negativamente a absorção de nitrato nos momentos iniciais do tratamento pelas raízes, visto que os valores de influxo de ^{15}N-nitrato decresceram até 3 h de deficiência de N. No entanto, houve a indução na aquisição de nitrato após este período, sendo que após 24 h de tratamento, o nível de influxo de nitrato atinge o mesmo valor (1,65 µmol h^{-1} g^{-1} MS) observado em plantas que se encontravam em condições de suficiência de N (+N) (Figura 7). A indução na absorção de nitrato atingiu seu maior nível 72 h após a restrição de N, período no qual o influxo ^{15}N-nitrato foi aproximadamente 3 vezes maior (4,50 µmol h^{-1} g^{-1} MS), quando comparado a raízes de plantas cultivadas em suficiência de N (tempo 0 h) (Figura 7). Esses resultados demonstraram que durante a deficiência de N (-N) ocorre uma regulação do HATS responsável pela aquisição de nitrato. Entretanto, a indução do processo de aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar é tardia (após 72 h; Figura 7).

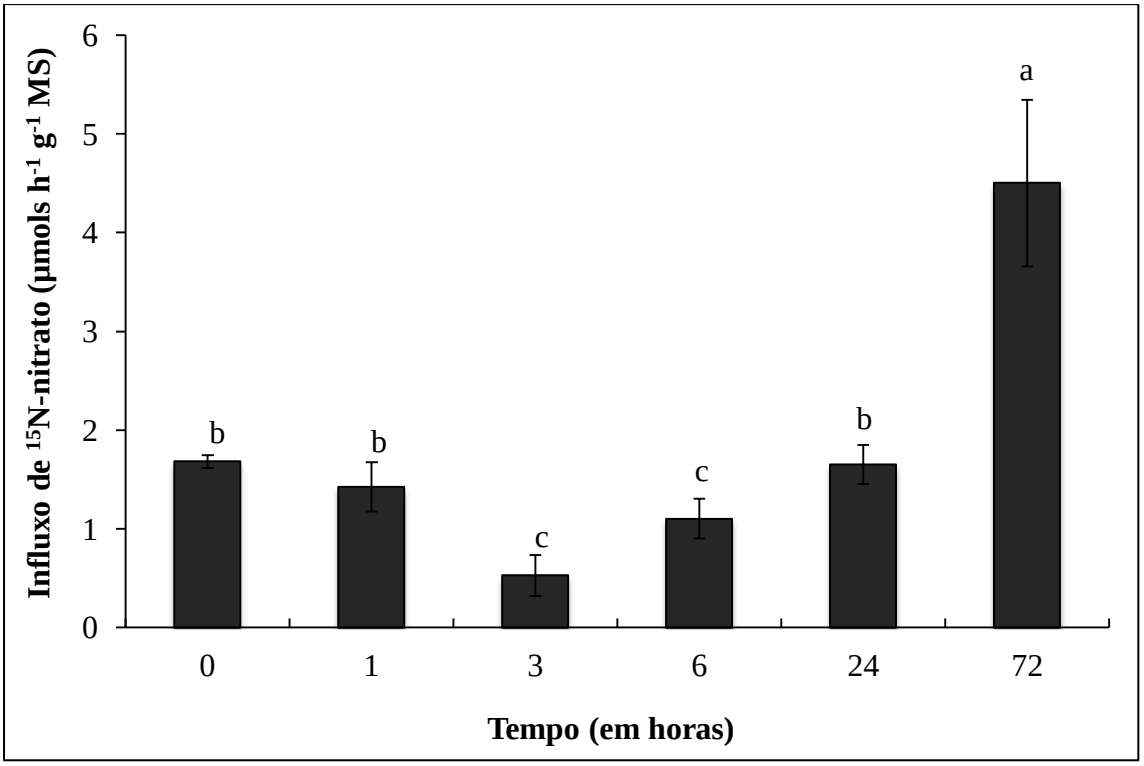


Figura 7 - Influxo de ^{15}N-NO_3^- em raízes de cana-de-açúcar submetidas à deficiência de N. Influxo de ^{15}N em raízes de cana-de-açúcar submetidas à deficiência de N (-N) por 1, 3, 6, 24 e 72 h, após serem cultivadas por três meses em condições normais de suplemento de N (+N; 2 mM NH_4NO_3. O controle positivo deriva de planta oriunda da solução suficiente em N (+N; 0 h). Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os horários amostrados pelo teste de Scott-Knott a 5%, *n*=4.

Mecanismo similar de indução do transporte de HATS sob limitação de nitrato também foi identificado em diversas espécies. Em arabidopsis, a absorção de nitrato em raízes de plantas submetidas à deficiência de N aumenta rapidamente, cerca de 2 vezes, após 24 h de tratamento, mantendo níveis similares até 48 h (LEJAY et al., 1999). Esse aumento no influxo em arabidopsis é transiente, pois após 72 h de restrição, a absorção de nitrato decresce a níveis equivalentes a condição de suficiência de N (LEJAY et al., 1999), demonstrando uma regulação temporal do processo de aquisição de nitrato. Regulação rápida do HATS similar a arabidopsis foi também identificada em raízes de tomateiro (ONO et al., 2000). Estudos de cinética de absorção utilizando ^{13}N em raízes de milho e cevada demonstram regulação semelhante, pois ocorre a indução da aquisição de nitrato 6 h após a restrição de N (LEE; RUDE, 1986; SIDDIQI et al., 1989; HOLE et al., 1990). No entanto, para outras espécies, como arroz (*Oryza sativa*), o azevém (*Lolium perene* L.) e uma conífera (*Picea glauca*), a aquisição de nitrato pela raiz é tardia, com aumento no influxo a partir de 3 h para alguma dessas espécies, atingindo o valor máximo de influxo com 72 ou 96 h após a deficiência de N (BOWMAN; PAUL, 1988; KRONZUCKER et al., 1995b; LI et al., 2006). As causas fisiológicas dessa fase de latência na resposta para absorção de nitrato durante a limitação de N ainda permanecem desconhecidas.

A relação do processo de aquisição de nitrato por HATS com a assimilação, resultando em glutamina e/ou asparagina, foi descrita como uma das possíveis causas da regulação do transporte de HATS. A redução dos níveis desses aminoácidos em células/tecidos específicos levam à indução de HATS, bem como a adição de exógena de N leva à repressão da aquisição de N em raízes (LEE et al., 1992, VIDMAR et al., 2000; GLASS et al., 2001). Evidências provêm de experimentos clássicos com *Ricinus communis*, onde a restrição de N em solução nutritiva levou ao decréscimo de 50% na concentração de glutamina no floema (TILLARD et al., 1998). Em cana-de-açúcar, plantas cultivadas por longos períodos sob nutrição exclusiva em diversas concentrações de nitrato ou amônio, apresentaram poucas diferenças no acúmulo de glutamina. No entanto, a concentração de asparagina é significativamente maior em plantas cultivadas sob nitrato em baixas concentrações (0,5 mM), quando comparado a amônio (BIGGS, 2003; ROBINSON et al., 2014), o que poderia indicar um efeito regulatório de asparagina durante a aquisição de nitrato em condições limitação de N. Por outro lado, experimentos com raízes de *Brassica napus* subdivididas (do inglês *Split-root*) no qual foram cultivadas em deficiência ou suficiência de N simultaneamente, permitiram concluir que aminoácidos não estariam envolvidos no controle de transporte de nitrato sob limitação de N.

Isto porque não foram identificadas alterações na composição de aminoácidos em raízes na presença de N (+N), apesar do maior influxo de ^{15}N-nitrato nas raízes sob limitação de N (-N) (LAINÉ et al., 1995), o que demonstra que uma sinalização de origem da parte aérea estaria envolvida na regulação da demanda de N na raiz sob deficiência de N.

Outros estudos sugerem que nitrato *per se* atua na regulação da sua aquisição em raízes, ou seja, a deficiência de nitrato em células/tecidos da raiz desencadearia uma sinalização para indução de HATS em raízes. Numa abordagem molecular, plantas de arroz transgênicas defectivas no transporte de nitrato da raiz para a parte aérea apresentaram uma homeostase de nitrato alterada nas raízes, com maior acúmulo de nitrato neste órgão e menor acúmulo na parte aérea quando comparado a plantas controle selvagem. Devido ao maior acúmulo de nitrato em raízes de plantas transgênicas, a aquisição de nitrato na faixa de alta-afinidade nestas plantas é inibida em comparação a plantas selvagens (TANG et al., 2012). Tal regulação no transporte HATS não foi observada em ensaios realizados com plantas selvagens de cevada, arabidopsis e alfafa (ZHUO et al., 1999; VIDMAR et al., 2000; RUFFEL et al., 2008), o que sugere a existência de distintos mecanismos de regulação do transporte de HATS sob limitação de N de acordo com a espécie.

Com os avanços na identificação dos genes responsáveis pelo transporte do tipo HATS e LATS no genoma de diversas espécies, vários estudos demonstraram a regulação distinta de genes em nível transcricional e pós-transcricional, e alguns desses estudos revelaram a sinalização na regulação do transporte de nitrato em plantas. Portanto, a análise de genes responsáveis pelo transporte do tipo HATS pode auxiliar na compreensão do processo de regulação tardia do processo de absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar sob deficiência de N.

Em plantas, a aquisição de nitrato pelas raízes é mediada por transportadores de membrana da família *NITRATE TRANSPORTERS* (*NRTs*). Estes transportadores são divididos em duas subfamílias de acordo com a afinidade ao substrato (baixa ou alta-afinidade) e foram identificados em várias espécies (SIDDIQI et al., 1990; LIU; TSAY, 2003; VIDMAR et al., 2000; QUAGGIOTTI et al., 2003; PLETT et al., 2010; FENG et al., 2011; BAI et al., 2013; von WITTGENSTEIN et al., 2014). Na subfamília *NRT1/PTR/OPT*, a maioria dos transportadores é de baixa-afinidade ao nitrato (faixa de mM) e esses atuam principalmente no transporte de LATS (TSAY et al., 1993; HATZFELD; SAITO, 1999; HUANG et al., 1999; FORDE, 2000; GLASS et al., 2001). O membro dessa família gênica de maior destaque em arabidopsis é o *AtNRT1.1*, que possui dupla afinidade ao transporte de nitrato (DODDEMA et al., 1979; LIU; TSAY, 2003). Em arabidopsis, o transportador

AtNRT1.1 é denominado de “transceptor” devido a sua habilidade de atuar como sensor de nitrato e transportador (HO et al., 2009). Em condições de baixa disponibilidade de nitrato, a proteína quinase CIPK23 fosforila o transportador *AtNRT1.1*, o que leva a mudança na alteração da afinidade dessa proteína ao substrato, ou seja de baixa para alta afinidade (HO et al., 2009); no entanto, essa afinidade dupla a nitrato ainda não foi demonstrada em outras espécies. A outra subfamília possui transportadores de alta afinidade (faixa de μM), denominada *NRT2*. Mutantes de arabidopsis para *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* possuem 80% do transporte de alta-afinidade reduzido quando comparados a plantas selvagens e possuem menor acúmulo de biomassa quando N está em baixas concentrações, evidenciando a importância destes dois transportadores na absorção de nitrato pelas raízes (FILLEUR et al., 2001). No entanto, a principal contribuição para o sistema de transporte de alta afinidade a nitrato compreende a proteína de membrana *NRT2.1*. Análise do mutante *nrt2.1* em arabidopsis demonstrou redução de 72% no influxo de nitrato na faixa de concentração de HATS, enquanto que no mutante *nrt2.2* decresce em apenas 19% a atividade de HATS (LI et al., 2007). Ainda, a análise de expressão dos genes *AtNRT2.1* aliada a estudos de influxo com nitrato marcado, demonstram que a expressão desse gene em arabidopsis é coordenada perfeitamente com a absorção de nitrato na faixa HATS, sendo induzidos sob deficiência de N (FILLEUR; VEDELE, 1999; LEJAY et al., 1999; CEREZO et al., 2001; ORSEL et al., 2006), o que demonstra que esse é o principal transportador de HATS durante a aquisição de fonte inorgânica de N (FILLEUR et al., 2001).

A maioria dos transportadores de alta-afinidade NRT2 é ativa na membrana plasmática quando transportadores NAR2 são coexpressos (TONG et al., 2005; OKAMOTO et al., 2006), formando o modelo de transporte de alta afinidade de dois componentes. Mutantes de arabidopsis para a proteína acessória NAR2 apresentaram diminuição drástica na atividade do transporte de alta afinidade (diminuição de 80% no influxo de nitrato), e na expressão de transportadores *NRT2*, principalmente *AtNRT2.1*, que apresenta sua expressão diminuída em 90% (ORSEL et al., 2006). Função fisiológica similar foi identificada para o *NAR2* em arroz, visto que o sistema de transporte de alta-afinidade de dois componentes também contribui para a absorção de nitrato na faixa de baixa e alta-afinidade (YAN et al., 2011). Tal conclusão foi possível pela análise do mutante *Osnar2.1* que apresentam menor influxo de nitrato em suas raízes quando comparados ao selvagem, quando expostos tanto a baixas como altas concentrações de nitrato (YAN et al., 2011). Logo, o complexo protéico NAR2/NRT2.1 na membrana plasmática de células radiculares é fundamental para absorção

de nitrato na faixa de HATS em diversas espécies (OKAMOTO et al., 2003; TONG et al., 2005; OKAMOTO et al., 2006; YAN et al., 2011).

Para correlacionar com os resultados de influxo de nitrato obtidos, os níveis de expressão dos genes ortólogos da família de transportadores *NRTs* de cana-de-açúcar previamente identificados (Dr. Joni Esrom Lima, informação verbal)[6], foram avaliados em raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas a deficiência N (-N), de acordo com as condições do experimento descrito anteriormente. Análise quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) do ortólogo para *ScNRT1.1* demonstrou variação pouca significativa na regulação desse gene sob limitação de N (Figura 8A), o que é um característica comum para membros de LATS (LIU; TSAY 2003). Quando comparado a suficiência de N (+N), houve indução mínima dos transcritos de *ScNRT1.1* após 3 e 72 h de restrição de N (Figura 8A). Porém, o padrão de indução não está diretamente correlacionado com a indução da aquisição de nitrato nessas condições de cultivo (Figura 7), o que sugere que *ScNRT1.1* não estaria envolvido nesse processo. Por outro lado, a expressão de genes reconhecidamente envolvidos no transporte de HATS foi fortemente regulada sob deficiência de N (-N). O padrão de expressão dos ortólogos *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* foi similar mediante a restrição de N (-N), apresentando co-regulação temporal. Durante o período compreendido entre a suficiência (+N) e 6 h após de restrição de N, os níveis de expressão não foram alterados (Figura 8B e C). Porém, no período seguinte analisado (24 h), houve acúmulo de transcritos dos genes codificadores de ambos transportadores de alta afinidade, sendo aproximadamente 8,5 vezes para *ScNRT2.1* e 2 vezes para *ScNAR2.1*. O maior acúmulo de transcritos desses genes foi observado 72 h após a deficiência de N, elevando ainda mais o acúmulo destes transcritos para 29 vezes *ScNRT2.1* e 5 vezes para *ScNAR2.1*, relativo a condição de suficiência de N (+N) (Figura 8B e C). Os genes dos transportadores *ScNRT2.1* e *ScNART2.1* acumularam transcritos mais tardiamente durante a restrição de N (-N), correlacionando com a indução de HATS identificada em experimentos de influxo de ^{15}N-nitrato em raízes de cana-de-açúcar (Figura 7). Portanto, a resposta análoga na transcrição de *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* à disponibilidade de N sugere a formação de complexo de transportadores na membrana plasmáticas de células radiculares em cana-de-açúcar, mecanismo semelhante ao observado em *A. thaliana* e *Oryza sativa* (ORSEL et al., 2006; CAI et al., 2008).

[6] Informação fornecida por J. E. Lima no CENA/USP em Piracicaba, em 2014.

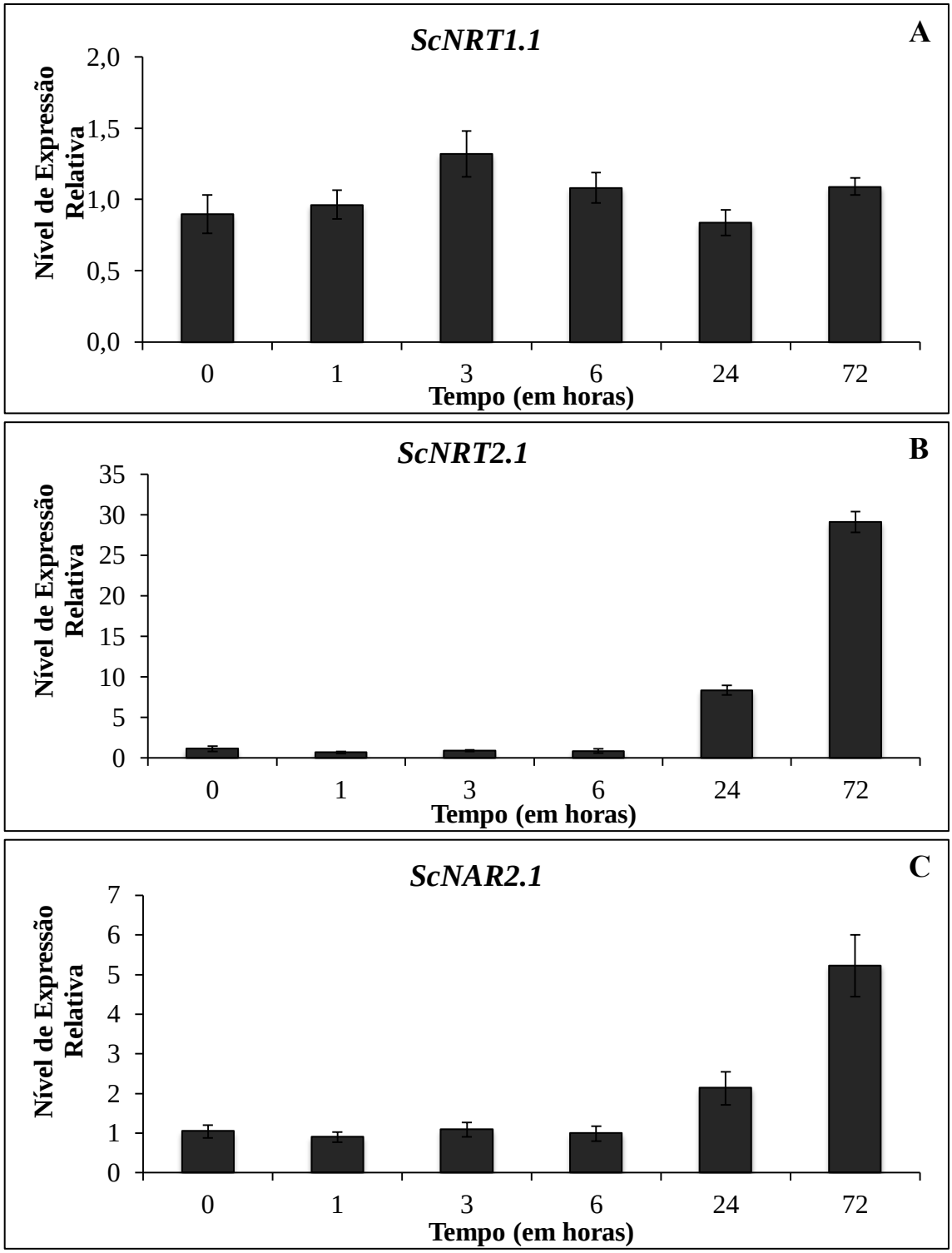


Figura 8 - Regulação de genes da família *NITRATE TRANSPORTERS* responsáveis pela aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar submetidas à deficiência de N. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar cultivadas por três meses em condições normais de suplemento de N (+N; 2 mM NH_4NO_3, tempo 0 h), sendo em seguidas submetidas à deficiência de N (-N) por 1, 3, 6, 24 e 72 h. Para as análises de expressão, o controle utilizado (normalizador) foi a média dos valores de expressão gênica obtidos para o tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH_4NO_3, tempo 0 h). O gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, *n*= 4-5 plantas por tempo amostrado.

Assim, a co-regulação do *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* com o acúmulo de transcritos parece tornar funcional o transporte de alta afinidade (HATS), o que, consequentemente, leva a indução da aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar em condições limitantes de N no solo. Apesar da regulação tardia (24 - 72 h) do HATS, os resultados não indicam que a aquisição de nitrato é limitante ou ineficiente durante a restrição de N, sendo que este sistema de transporte se apresentou funcional e efetivo nessas condições.

4.1.3. Regulação do processo de absorção de nitrato por amônio em raízes de cana-de-açúcar

Mediante as flutuações na concentração de N inorgânico no solo, as raízes das plantas respondem rapidamente regulando os transportadores de nitrato ou amônio, estimulando o influxo de N sob condições de limitação ou na repressão do influxo sob excesso desse nutriente (GLASS et al., 2002; BRITTO; KRONZUCKER, 2013). Porém, o status de N na planta não é o único mecanismo de regulação da aquisição deste nutriente. O efeito inibitório de amônio na absorção de nitrato em diversas espécies foi identificado em trabalhos clássicos (FRIED et al., 1965; DODDEMA; TELKAMP, 1979; GLASS et al., 1985; BLOOM; FINAZZO, 1986; CHAILLOU et al., 1994; KRAPP et al., 1998; KRONZUCKER et al., 1999). Devido a diferenças de cargas entre íons de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), é evidente que amônio afeta o transporte de nitrato devido a despolarização da membrana plasmática; porém, este efeito é comprovadamente transiente e rápido, já que o gradiente de potencial de membrana é reestabelecido após 30 minutos (ULLRICH et al., 1984; WANG et al., 1993a; 1993b). Trabalhos recentes indicam a possibilidade de ocorrer a hiperpolarização da membrana plasmática mediante a exposição ao amônio (NIEVES-CORDONES et al., 2008). Logo, a despolarização da membrana plasmática não pode ser responsável pela inibição por longos períodos exercida pelo amônio durante o processo de aquisição de nitrato por raízes. Estudos com outros íons, como fosfato e sulfato, mostraram que não há alteração de cotransporte destes com prótons (COX; REISERNAUER, 1973; LEE; DREW, 1989). De maneira similar, não existe evidência de que a alteração na homeostase de potássio seria responsável pela inibição causada por amônio, considerando que a provisão de potássio causa a despolarização da membrana plasmáticas semelhante a amônio; porém, não inibe a absorção de nitrato (GLASS; SIDDIQI, 1995; WANG et al., 1996). Portanto, o efeito inibitório de amônio deve ser devido à ação direta no processo de absorção de nitrato em raízes. Este efeito foi comprovado por experimentos realizados em raízes de plantas de cevada cultivadas sob

várias concentrações de nitrato. Por meio de estudos de influxo com ^{15}N-nitrato, observou-se que a adição de 1 mM de amônio reduz significantemente o influxo de nitrato marcado, principalmente em plantas cultivadas sob baixas concentrações de nitrato, enquanto que o efeito inibitório do amônio em plantas cultivadas sob altas concentrações externas de nitrato é mínimo e não significativo (KRONZUCKER et al., 1999). Esses resultados demonstram que amônio exerce um efeito negativo no transporte de HATS para nitrato, mas não em LATS (KRONZUCKER et al., 1999).

Com o objetivo de investigar se há regulação por amônio no influxo de alta-afinidade a nitrato em raízes de cana-de-açúcar, plantas de três meses cultivadas em solução nutritiva suficiente em N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram submetidas a tratamento com 2 mM de nitrato ou 2 mM de amônio. As plantas foram analisadas quanto ao influxo de ^{15}N-nitrato na faixa de alta afinidade (0,2 mM de ^{15}N) nos tempos 0, 2, 6, 24, e 72 h de exposição à fonte inorgânica de N.

Em relação ao tratamento de nitrato de amônio (2 mM) no tempo 0 h, o influxo de ^{15}N-nitrato foi induzido igualmente para os tratamentos de nitrato ou amônio exógeno nos períodos iniciais (2 h) (Figura 9). Somente após 6h de exposição às duas fontes inorgânicas de N foi possível observar diferença, mas ainda não significativa no influxo de ^{15}N-nitrato. Quando colocadas em presença de nitrato, foi observado indução no influxo de N-marcado, o qual atingiu valor 2,5 vezes maior (4,63 μmol h^{-1} g^{-1} MS) do que o influxo observado em presença de amônio (1,86 μmol h^{-1} g^{-1} MS) (Figura 9). Diferença significativa foi observada após 24 h, mesmo com o nível de indução de absorção de nitrato semelhante ao observado anteriormente (6 h), já que houve queda no influxo de nitrato em presença de amônio neste período (1,20 μmol h^{-1} g^{-1} MS). Níveis máximos de aquisição de nitrato foram observados após 72 h, no qual foi observada uma indução de 10 vezes para o influxo de ^{15}N-nitrato (19,77 μmol h^{-1} g^{-1} MS) (Figura 9). Contrariamente ao observado em presença de nitrato, a adição de amônio não levou a indução do processo de aquisição de ^{15}N-nitrato em raízes de cana-de-açúcar em todos os tempos avaliados (Figura 9). Esses resultados evidenciam, portanto, uma regulação negativa na aquisição de nitrato pela fonte inorgânica amônio em raízes de cana-de-açúcar (Figura 9).

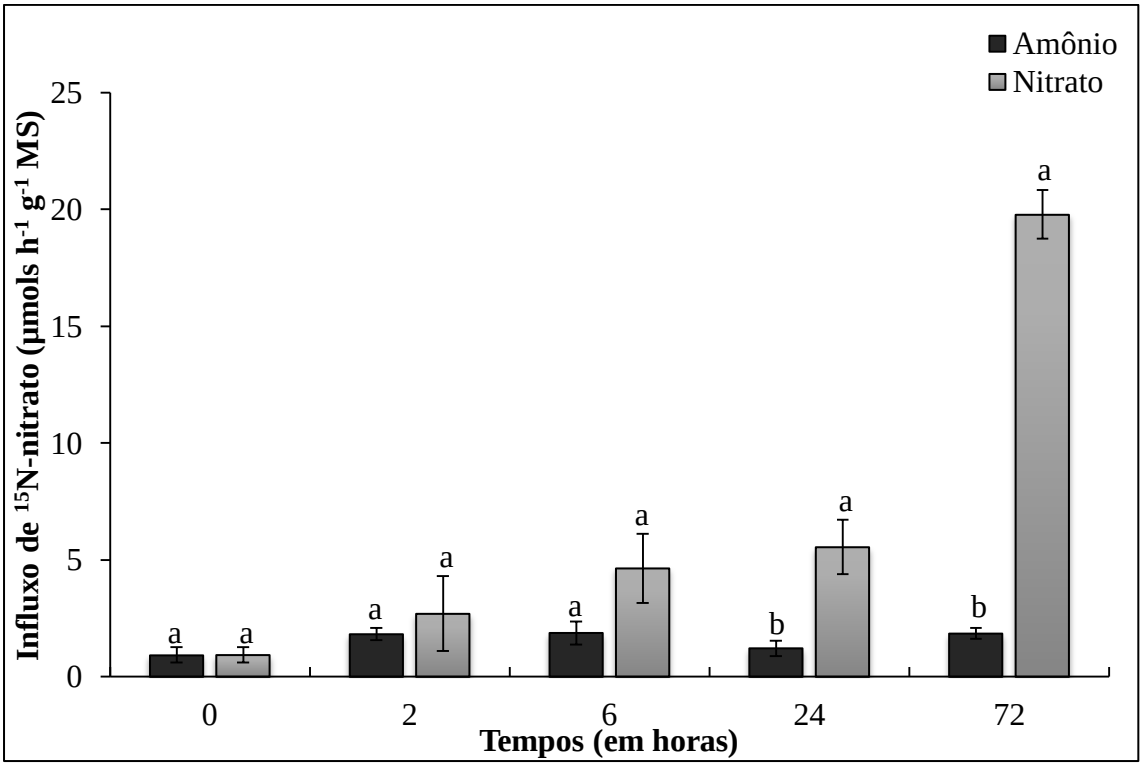


Figura 9 - Influxo de $^{15}N\text{-}NO_3^-$ em raízes de cana-de-açúcar submetidas a diferentes fontes inorgânicas de N. As plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas por 3 meses em condições de suficiência de N (+N; 2 mM NH_4NO_3) e após esse período foram submetidas a tratamentos com 2 mM de nitrato ou 2 mM de amônio, e suas raízes foram amostradas nos tempos de 0, 2, 6, 24, e 72 horas para avaliação do influxo de $^{15}N\text{-}NO_3^-$. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre amônio e nitrato dentro de cada tempo amostrado pelo teste de Scott-Knott a 5%, *n*=4.

Em *N. plumbaginiolia* mecanismo regulatório semelhante também foi evidenciado, visto que o influxo de nitrato em presença de amônio diminuiu em 60% (KRAPP et al. 1998). Experimentos com arabidopsis também mostraram *feedback* negativo exercido por amônio na absorção de nitrato, considerando que o influxo de nitrato foi 3 vezes menor 24 h após o acréscimo de amônio em uma solução nutritiva que continha apenas nitrato como fonte de N (CEREZO et al., 2001), o que demonstra ser um mecanismo conservado entre dicotiledôneas e monocotiledôneas. A inibição do influxo nitrato por HATS mediado por amônio pode ser devido ao amônio *per se* ou ainda, devido a produtos da assimilação, como glutamina, os quais exercem um *feedback* negativo no transporte de nitrato de acordo com a demanda de N da planta (ZHUO et al., 1999; VIDMAR et al., 2000). Evidências para isso vêm da regulação negativa do gene *NRT2.1* pela adição exógena de aminoácidos e amônio em raízes de arabidopsis, comprovando o envolvimento de HATS nesse mecanismo (LEJAY et al., 1999; ZHUO et al., 1999; NAZOA et al., 2003). Análises de influxo de nitrato marcado no mutante *nrt2.1* de arabidopsis demonstram o envolvimento desse gene nesse mecanismo. Por meio de

uma sinalização ainda desconhecida, em condições de baixo nitrato/alto amônio, ocorre a repressão dos genes *NRT2.1* e *NAR2.1* reduzindo a atuação do HATS para aquisição de nitrato (KROUK et al., 2006).

Para a caracterização molecular do processo de absorção de nitrato regulado pela fonte inorgânica de N, foram realizadas análises de expressão dos genes ortólogos dos transportadores de nitrato (*ScNRT1.1*; *ScNRT2.1*; *ScNAR2.1*) envolvidos em tal processo (Figura 10). Em relação ao tempo 0 h, o gene ortólogo ao transportador *NRT1.1* de cana-de-açúcar *ScNRT1.1*, demonstrou um acúmulo rápido e significativo de transcritos 2 h após aplicação exógena de nitrato e amônio (Figura 10A). Os maiores níveis de acúmulo ocorreram para o tratamento exógeno de nitrato, sendo 2 vezes mais expresso quando comparado com a aplicação de amônio 2h após tratamento (Figura 10A). Nos demais tempos amostrados, não houve diferença significativa na expressão gênica deste transportador entre os tratamentos com fontes inorgânicas de N (Figura 10A).

Da mesma forma, foi detectada regulação transcricional para ambas as fontes de N para os genes que codificam transportadores de alta afinidade *ScNRT2.1*. O acúmulo de transcritos de *ScNRT2.1* foi evidente já após 2 h de exposição a nitrato, apresentando 22 vezes mais acúmulo de transcritos em relação ao tempo inicial avaliado (Figura 10B). Nos tempos subsequentes, um aumento significativo foi observado para expressão de *ScNRT2.1*, apresentando indução de 210 vezes e 130 vezes no acúmulo de transcritos para o mesmo tratamento de N as 6 e 72 horas, respectivamente (Figura 10B). Com o fornecimento exógeno de amônio, no entanto, a indução de *ScNRT2.1* foi transiente, apresentando os maiores níveis de expressão apenas 2 h após ao tratamento exógeno, seguido por níveis similares de expressão nos tempos subsequentes avaliados (Figura 10B). Fica evidente que a indução do gene *ScNRT2.1* por amônio foi mínima quando comparada a indução apresentada pelo adição de nitrato (Figura 10B).

O outro gene para o transportador de nitrato de alta afinidade *ScNAR2.1* apresentou padrão de expressão semelhante ao gene *ScNRT2.1*. Esse gene foi induzido estritamente pela adição de nitrato, sendo induzido significativamente após 2 h de tratamento e apresentando crescentes níveis de acúmulo de transcritos, atingindo o máximo com 72 h após aplicação externa de nitrato (Figura 10C). Contrariamente ao *ScNRT2.1*, o gene *ScNAR2.1* não apresentou regulação por amônio em nenhum dos tempos avaliados (Figura 10C).

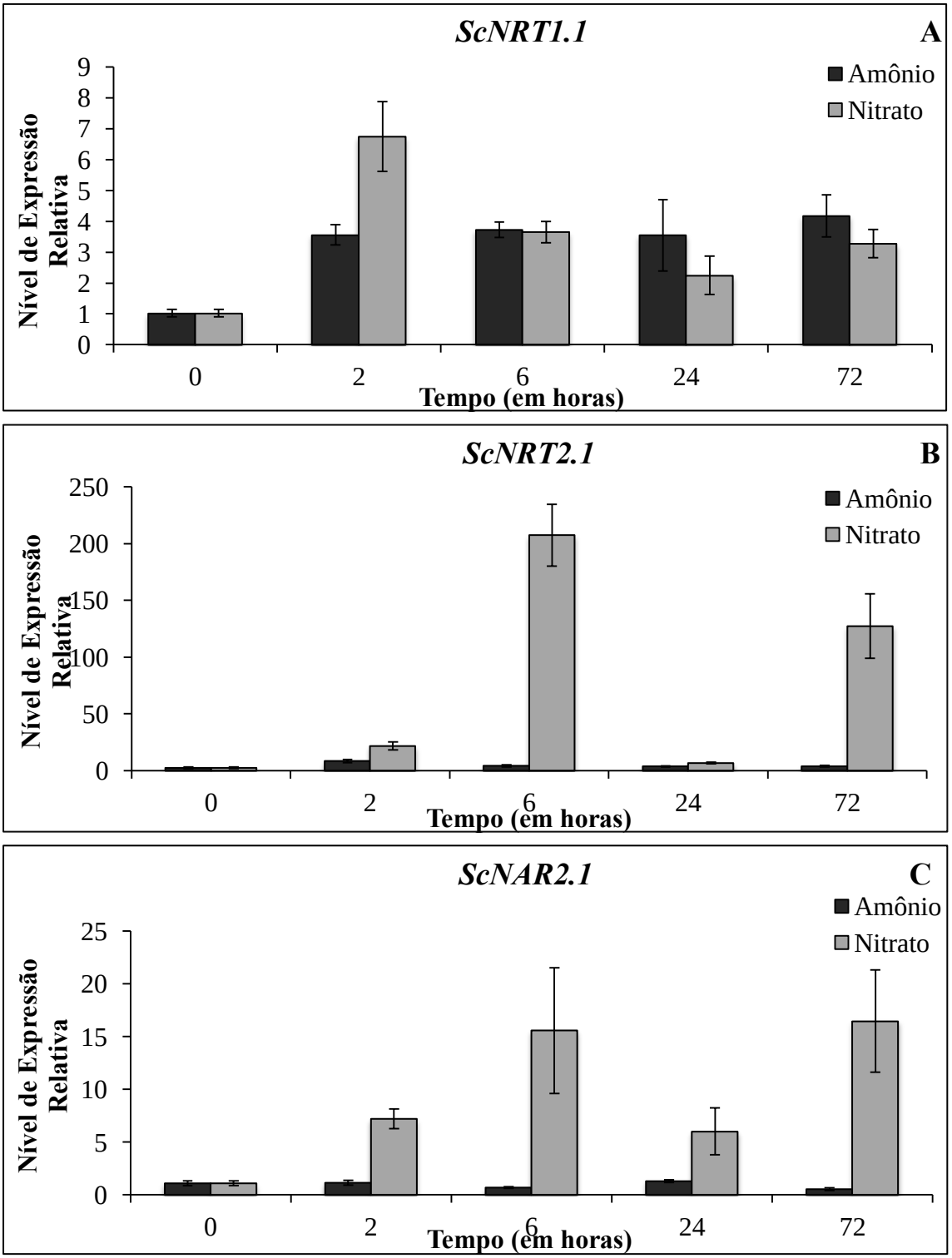


Figura 10 - Regulação transcricional de genes *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar submetidas a diferentes fontes inorgânicas de N. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar submetidas a tratamento de suficiência de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) por três dias, seguidas de tratamento com 2 mM de nitrato ou 2 mM de amônio, nos tempos 0, 2, 6, 24, e 72 h após os respectivos tratamentos. Para as análises de expressão, o controle utilizado (normalizador) foi a média dos valores de expressão gênica obtidos para o tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH_4NO_3, tempo 0 h). O gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, *n*= 4-5 plantas por tempo amostrado

Com base nesses resultados é possível sugerir que a inibição exercida por amônio ocorre através da repressão dos genes *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* em raízes de cana-de-açúcar, sendo que apenas o gene *ScNRT2.1* foi regulado por amônio e de forma limitada e transiente (2 h após a exposição a amônio, Figura 10C). A indução de *ScNRT1.1* por amônio, por outro lado, pode ser a causa da leve indução nos níveis de aquisição de nitrato marcado quando comparado a partir do tempo 0 h pelos dados da análise de influxo em raízes de cana-de-açúcar logo após a aplicação de amônio (Figura 9), sendo que esse gene foi induzido a partir do mesmo período e permanece constante em seus níveis de expressão em relação ao tempo inicial (Figura 10A). Considerando o mecanismo proposto em arabidopsis, no qual amônio reprime o transporte por HATS de nitrato, ou seja, via *AtNRT2.1* e *AtNAR2.1* (KROUK et al., 2006), é possível sugerir que mecanismo similar esteja presente em raízes de cana-de-açúcar.

A existência dessa regulação no transporte de alta afinidade a nitrato por amônio foi descrita em arabidopsis como um mecanismo essencial para atenuação dos efeitos tóxicos causado pelo amônio (KROUK et al, 2006). É de ampla aceitação que para a maioria das espécies, o cultivo com amônio como fonte única de N causa efeitos tóxicos no desenvolvimento de plantas (GIVAN, 1979; HAGEMAN, 1984; SALSAC et al., 1987; RAVEN et al., 1992; KRONZUCKER et al., 2001; BRITTO et al., 2001; BRITTO; KRONZUCKER, 2002). A exemplo disso, há vários relatos de redução de crescimento e produtividade mesmo em espécies que possuem preferência por amônio em relação a nitrato (BLOOM et al., 1992; SALSAC et al., 1987, BRITTO; KRONZUCKER, 2002). Logo, as plantas devem ter evoluído a capacidade de apresentar o sistema de aquisição a nitrato induzido em condições de alta exposição a amônio, para atenuar esses efeitos tóxicos causados pela nutrição a amônio (COX; REISERNAUER, 1973; KRONZUCKER et al., 1999; RAHAYU et al., 2005).

No caso de cana-de-açúcar, no entanto, os experimentos aqui apresentados sugerem uma leve indução na aquisição de nitrato sob condições de cultivo com amônio como fonte única de N (Figura 9), que foi acompanhada pelo aumento dos níveis de expressão do gene do transportador *NRT1.1*, mas não para os genes dos transportadores envolvidos em HATS para nitrato (Figura 10). Com base nessas evidências é possível sugerir que raízes de cana-de-açúcar possuem um mecanismo conservado de repressão do transporte de HATS para nitrato mediante a exposição a amônio, considerando a regulação sutil apresentada aqui. Cabe ressaltar que em solos cultivado com cana-de-açúcar não ocorre a presença exclusiva de amônio com fonte inorgânica de N, mas a razão amônio/nitrato no solo pode flutuar ao longo

do ciclo de cultivo dessa gramínea (WOLT, 1994; MEIER et al., 2006; ROBINSON et al., 2011). Nessas condições, amônio pode exercer um *feedback* negativo na aquisição de nitrato via HATS, *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1*, levando a redução da aquisição dessa fonte inorgânica de N.

Apesar da preferência por amônio (Figura 6; ROBINSON et al., 2011), o transporte de nitrato apresentou-se ativo em raízes sob exposição exógena de amônio. Estudos em condições controladas de cultivo em solução nutritiva demonstraram que o melhor crescimento/desenvolvimento de plantas de cana-de-açúcar ocorre na presença de ambas as fontes inorgânicas de N (RAVEN et al., 1992). Com isso, plantas de cana-de-açúcar asseguram a demanda de nutrição de ambas às fontes de N, de acordo com regulação na aquisição de nitrato e amônio mediante as flutuações das concentrações de N no solo. Em arabidopsis, uma sinalização dependente do transportador *NRT1.1* atuante na regulação no transporte de HATS para nitrato foi relacionada com a demanda nutricional a alta disponibilidade de nitrato. Quando comparado a plantas selvagens de arabidopsis, o mutantes no gene *Atnrt1.1* apresenta maior capacidade de induzir a aquisição de nitrato na faixa de HATS, isso devido a ausência de repressão de *AtNRT2.1* e *AtNAR2.1* quando submetido a tratamento de alto nitrato (KROUK et al., 2006). Portanto, durante a exposição a alto nitrato, *NRT1.1* atua na repressão de *NRT2.1* e *NAR2.1* impedindo a aquisição dessa fonte inorgânica de N de acordo com demanda de N da planta (KROUK et al., 2006). Esse mecanismo regulatório demonstrou-se independente da regulação por amônio no transporte de HATS, sendo que amônio ou produtos da sua assimilação, não dependem da sinalização de *NRT1.1*, considerando que o mutante nesse gene apresenta efeitos tóxicos similares a amônio e repressão de HATS para nitrato mediante a exposição a amônio (KROUK et al., 2006).

A manutenção de maiores níveis de expressão de *ScNRT1.1* em raízes de plantas de cana-de-açúcar cultivadas sob nutrição exclusiva de amônio em relação ao tempo 0 h (nutrição por nitrato de amônio) indicam que esse transportador atua na nutrição basal de nitrato, ou seja, como cHATS (do inglês *constitutive* HATS; CRAWFORD; GLASS, 1998), o que explicaria a baixa indução de influxo de ^{15}N-nitrato nas primeiras horas após a adição exógena de amônio (Figura 9). Nessa condição, como amônio é fonte preferencial de N para raízes de cana-de-açúcar (Figura 6; ROBINSON et al., 2011), a maior aquisição de amônio poderia também inibir o influxo de nitrato, através da repressão dos genes responsáveis pelo transporte de HATS, *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1*, mantendo assim a baixa aquisição de nitrato.

Com base na heterogeneidade espacial e temporal da disponibilidade de nitrato e amônio em solos com cultivo de cana-de-açúcar, no qual a média de concentração de amônio

varia entre 0,7 a 1,5 mM e 4,5 a 9,8 mM para nitrato (WOLT, 1994; MILLER et al., 2007; ROBINSON et al., 2011), a repressão de HATS para nitrato mediado por amônio parece ser um mecanismo plausível de ocorrer em solos, diminuindo portanto a eficiência na absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar. No entanto, como esse mecanismo é conservado em outras espécies cultivadas, como cevada (KRONZUCKER et al., 1999; BRITTO; KRONZUCKER, 2013), que possui maior eficiência na absorção de nitrato quando comparado à cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011), é pouco provável que a repressão no transporte de HATS para nitrato, causada por amônio descrita aqui, seja o principal fator da reduzida capacidade de absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar.

4.1.4. Regulação do transporte de nitrato em raízes de cana-de-açúcar durante provisão de nitrato

Estudos fisiológicos do transporte de nitrato em raízes de diversas espécies demonstram a importância do transporte de HATS dessa forma inorgânica de N mediante a provisão de nitrato. Após a adição exógena de nitrato, existe a indução rápida do influxo de nitrato por alta-afinidade, chamado de iHATS (do inglês *inducible* HATS), o qual permanece induzido por algumas horas, seguida de rápida queda desse influxo de nitrato em raízes (TOMPKINS et al., 1978; SIDDIQI et al., 1990; TISCHNER et al., 1993; ZHUO et al., 1999; GLASS, 2003). Essa indução do sistema de HATS pela adição exógena de nitrato ocorre tanto em plantas pré-cultivadas em suficiência de N, quanto em plantas crescidas em deficiência e/ou baixo N (GLASS et al., 2002). Variações importantes entre espécies foram identificados em relação ao tempo de indução do sistema iHATS. Por exemplo, na conífera *Picea glauca* a indução de influxo de ^{13}N-nitrato ocorre após três dias de provisão a nitrato (KRONZUCKER et al.,1995b), enquanto que, em raízes de cevada e trigo, a maior aquisição de nitrato se dá após 3 h (TOMPKINS et al., 1978; SIDDIQI et al., 1990; TISCHNER et al., 1993). Ainda, a indução de sistema iHATS ocorre não somente sob provisão de nitrato (NO_3^-), mas também de nitrito (NO_2^-) (SIDDIQI et al., 1992; ASLAM; HUFFAKER, 1993; KRAPP et al., 1998; LEJAY et al., 1999), o que sugere que ambos atuam na sinalização comum na regulação do transporte de HATS.

Visando a melhor compreensão da fisiologia da absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar, estudos de influxo rápido de ^{15}N-nitrato mediante a provisão de nitrato foram realizados em plantas cultivadas em solução nutritiva. Após três meses de cultivo em solução nutritiva repleta de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3), as plantas foram submetidas a limitação de N

por 72 h. Após esse período, as plantas foram submetidas a adição exógena de nitrato (2 mM de nitrato como fonte única de N), e estudos de influxo de nitrato marcado foram realizados nos períodos 0, 2, 4 e 24 h após a provisão de nitrato na faixa de alta-afinidade (0,2 mM ^{15}N-nitrato; OKAMOTO et al., 2006).

A análise temporal de influxo de ^{15}N indicou a inibição do processo de aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar, sendo que o influxo de nitrato marcado decresceu significativamente 30% (1,64 µmol h^{-1} g^{-1} MS) e 55% (1,15 µmol h^{-1} g^{-1} MS) após 2 e 4h de exposição a nitrato em relação ao período inicial (2,33 µmol h^{-1} g^{-1} MS) (Figura 11). Mesmo após 24 h de provisão de nitrato, o influxo de ^{15}N-nitrato permaneceu aproximadamente 34% menor (1,54 µmol h^{-1} g^{-1} MS) aos níveis de influxo durante a limitação de N (tempo 0 h). Com base nesses resultados é possível inferir que a absorção de nitrato é regulada mediante a provisão de nitrato, apresentando repressão do influxo de nitrato e não indução de HATS, como previamente identificado em outras espécies (TOMPKINS et al., 1978; SIDDIQI et al., 1990; TISCHNER et al., 1993; KRONZUCKER et al., 1995; KRAPP et al., 1998; LEJAY et al., 1999).

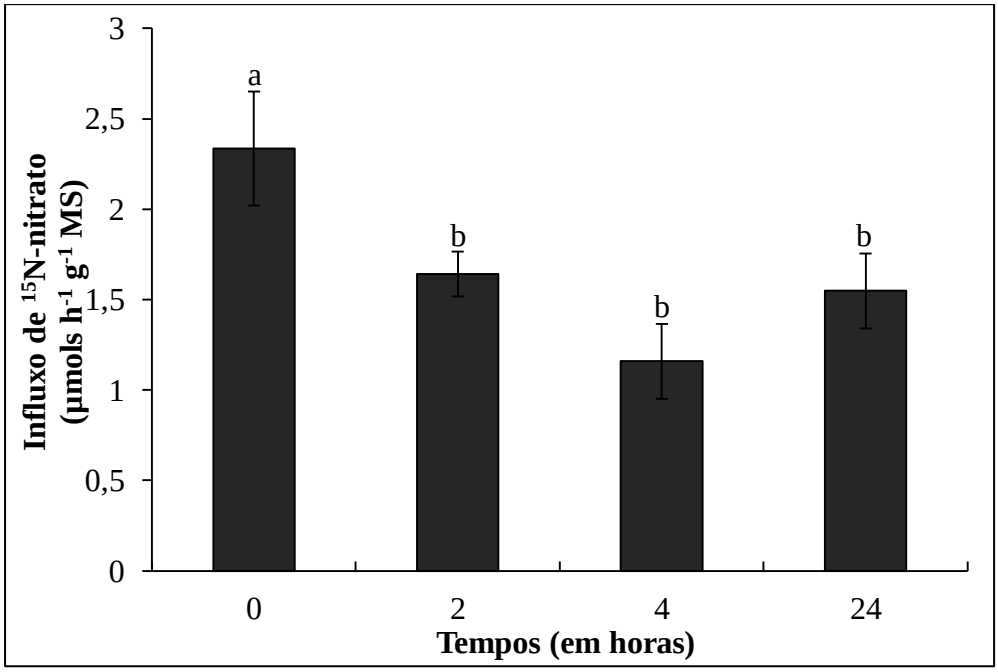
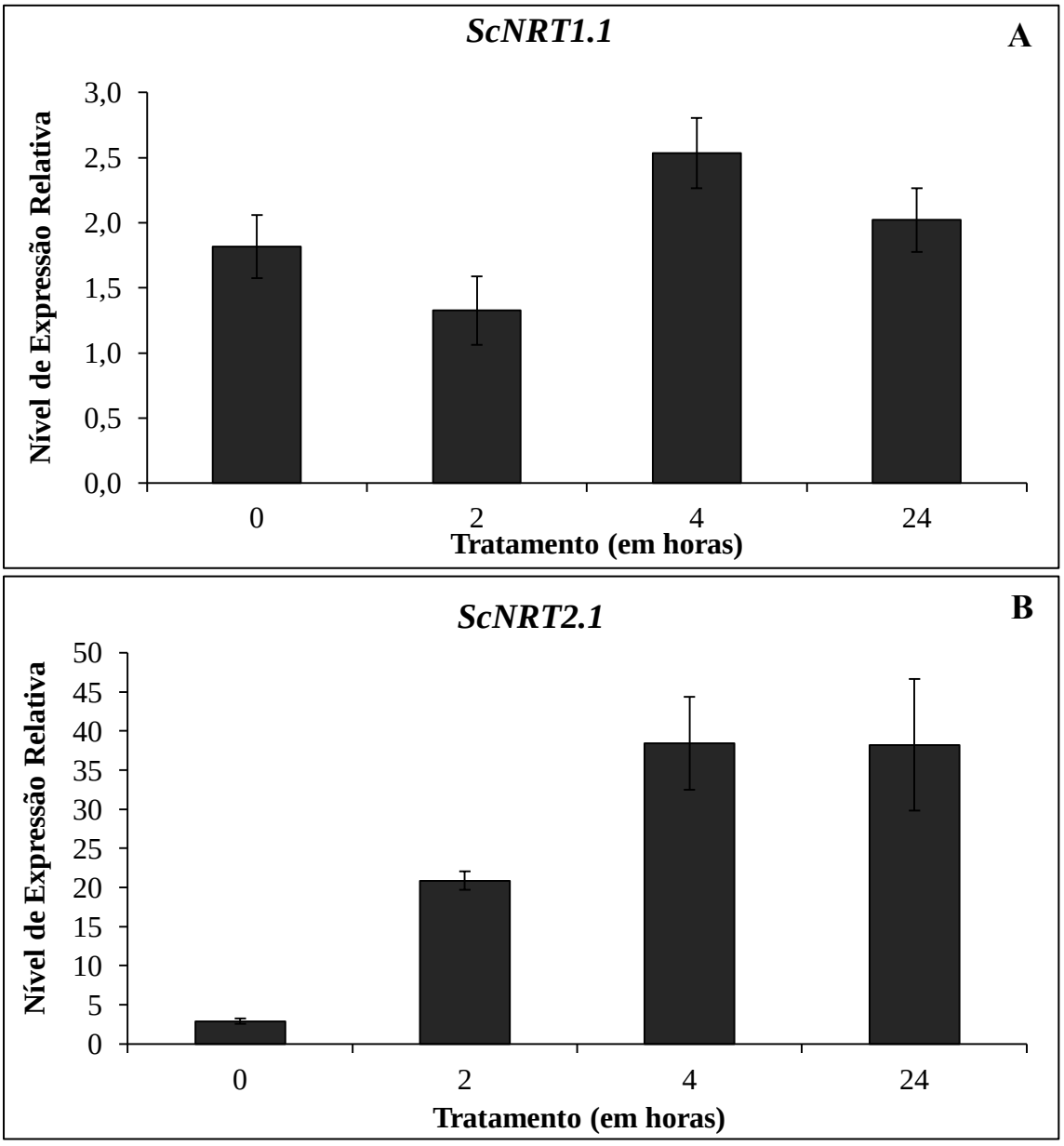


Figura 11 - Influxo de ^{15}N-NO_3^- em raízes de cana-de-açúcar submetidas a deficiência e provisão de N. As plantas de cana-de-açúcar foram cultivadas por 3 meses em condições de suficiência de N (+N; 2 mM NH_4NO_3) e após esse período foram submetidas à deficiência de N (-N) por 72 horas, sendo posteriormente ressuplementadas com N (2 mM de KNO_3). Após a ressuplementação, as plantas foram transferidas a soluções contendo ^{15}N-NO_3^- (0,2 mM) e então as raízes foram amostradas nos tempos de 0, 2, 4 e 24 horas. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os horários amostrados pelo teste de Scott-Knott a 5%, *n*=4

Considerando que a indução do transporte de HATS correlaciona-se diretamente com a transcrição dos transportadores de alta-afinidade a nitrato em várias espécies (LEJAY et al., 1999; FILLEUR et al., 2001; ORSEL et al., 2006; LI et al., 2007), a análise da expressão de genes ortólogos em cana-de-açúcar foi realizada a partir de amostras de plantas cultivadas em condições de provisão de nitrato. Para isso, a expressão de *ScNRT1;1*, transportador de dupla afinidade a nitrato foi avaliada para verificar se mediante a provisão de nitrato, maiores níveis de indução desse transportador poderiam regular o transporte de HATS. A proteína de membrana *NRT1.1* atua no transporte de alta afinidade quando o aminoácido T101 é fosforilado e atua na faixa de baixa afinidade mediante a desfosforilação desse mesmo aminoácido (LIU; TSAY, 2003). A fosforilação em T101 do transportador é desencadeada de acordo com a concentração de nitrato no solo. Quando nitrato está presente em baixas concentrações, a proteína quinase CIPK23 (*CBL-interacting protein kinase 23*) fosforila T101 no transportador *NRT1.1*, mantendo baixos os níveis de expressão de genes responsáveis pela resposta de HATS, e.g. *NRT2.1* (HO et al., 2009). Portanto, *NRT1.1* além de ser fundamental na aquisição de nitrato na faixa de alta e baixa afinidade, também atua como sensor de concentrações de nitrato, modulando a resposta de HATS (HO et al., 2009). No entanto, vale ressaltar que ainda permanece por ser elucidado se tal mecanismo regulatório também existe em outras espécies.

Com o objetivo de verificar se os menores níveis de aquisição nitrato se devem a maior indução de *ScNRT1.1* e, portanto, pela a repressão dos genes de HATS em raízes de cana-de-açúcar, foi avaliada a expressão desses genes em plantas cultivadas sob provisão de nitrato. O gene do transportador *ScNRT1.1* apresentou pouca variação no acúmulo de transcritos no tempos avaliados, sendo que uma indução de 2 vezes nos transcritos de *ScNRT1.1* foi observado após 4 h de exposição exógena a nitrato (Figura 12A). Após 24 h, os níveis de transcritos para esse gene permaneceram similar ao período inicial (0 h) (Figura 12A). Baseado nesses resultados, o acúmulo transiente de transcritos de *ScNRT1.1* após 4 h de exposição a nitrato pode indicar a repressão de genes responsáveis pelo transporte de HATS. Contrariamente, os transportadores de alta-afinidade *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* apresentaram padrão similar de indução no acúmulo de transcritos. Comparado com o nível de expressão observado em plantas submetidas à deficiência (0 h), o nível de expressão observado 2h após a provisão de nitrato aumentou aproximadamente 7 vezes para o transportador *ScNRT2.1* e 7,5 vezes para o *ScNAR2.1* (Figura 12B e C). Após 4 h de tratamento, nova indução foi observada em ambos os transportadores. O nível de transcritos de *ScNRT2.1* neste período foi de

aproximadamente 13 vezes maior do que o observado em no primeiro período analisado (0 h), enquanto que para o *ScNAR2.1* o aumento no acúmulo de transcrito foi de 33 vezes mais comparado ao mesmo período (0 h) (Figura 12B e C). No entanto, diferenças na regulação desses genes foram observadas após 24 h de tratamento exógeno de nitrato. Enquanto o acúmulo de transcrito do transportador *ScNRT2.1* permaneceu alto, semelhante ao observado após 4h de exposição ao tratamento, houve queda no acúmulo de transcritos do transportador *ScNAR2.1* (Figura 12B e C).



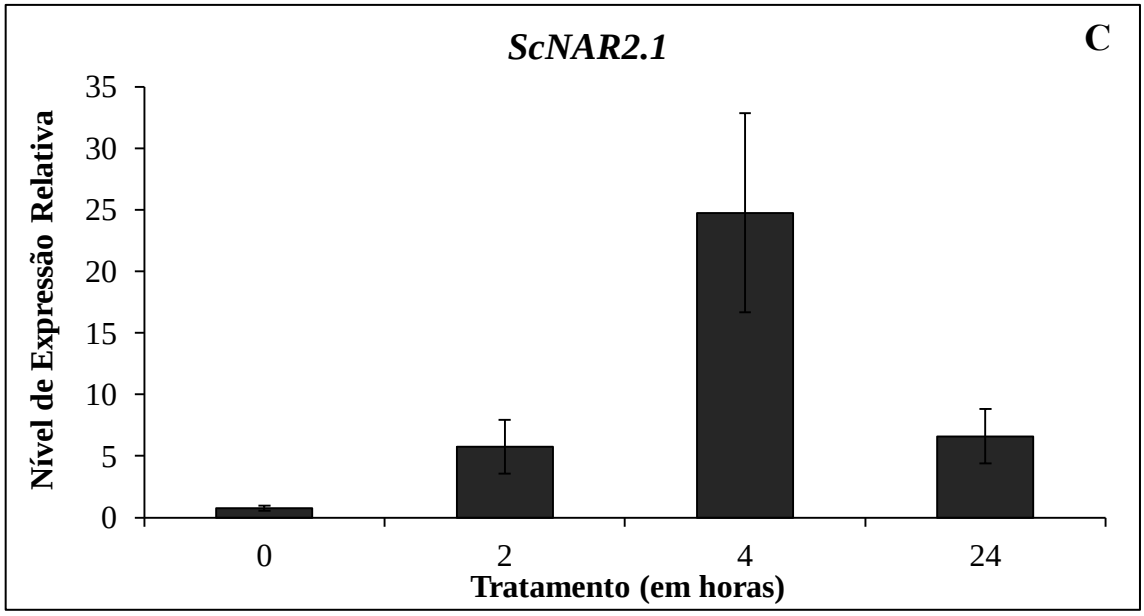


Figura 12 - Regulação de genes da família *NITRATE TRANSPORTERS* responsáveis pela aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar submetidas à provisão de nitrato. Os níveis de transcritos foram determinados em raízes de cana-de-açúcar cultivadas por três meses em condições normais de suplemento de N (+N; 2 mM NH_4NO_3), sendo em seguidas submetidas à deficiência de N (-N) por 72 horas. Após este período, foram ressuplementadas com N (2 mM de KNO_3) por 2, 4 e 24 h. Para as análises de expressão, o controle utilizado (normalizador) foi a média dos valores de expressão gênica obtidos para o tratamento de restrição de suficiente por 72 h (-N; tempo 0 h). O gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, *n*= 4-5 plantas por tempo amostrado.

Esses resultados sugerem que: i) a indução transiente de *ScNRT1.1* não levou a repressão de genes responsáveis pela aquisição de nitrato na faixa de HATS ou no influxo de nitrato marcado; ii) não existe a co-regulação dos genes responsáveis pelo HATS, *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1*, em todos os tempos avaliados em raízes de cana-de-açúcar suplementada com nitrato, o que pode ser responsável pelos baixos níveis de influxo de ^{15}N-nitrato; iii) não houve correlação entre a expressão de *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* com o influxo de ^{15}N-nitrato durante a provisão de nitrato, sendo que, enquanto a absorção de nitrato em raízes de cana-de-açúcar diminui significantemente, ocorre a indução dos genes responsáveis pela aquisição de nitrato. Esta ausência de correlação pode indicar a existência de uma regulação em nível pós-transcricional dos transportadores de HATS em raízes de cana-de-açúcar, ou ainda, que o genótipo utilizado no presente trabalho, 'SP80-3280', seja defectivo na indução do sistema de HATS sob provisão de nitrato.

Em arabidopsis foi demonstrado que altas concentrações de nitrato de amônio desencadeiam uma possível resposta pós-transcricional de HATS em raízes (FRAISIER et al., 2000). Análises fisiológicas em plantas transgênicas superexpressando *NpNRT2.1* em *N.*

plumbaginifolia demonstram que sob provisão de altas concentrações exógenas de nitrato de amônio (10 mM NH_4NO_3), estas plantas apresentam altos níveis de transcritos de *NpNRT2.1*, apesar desse gene ser reprimido nessas condições em plantas selvagens. O influxo de nitrato por sua vez é reduzido de maneira similar entre plantas transgênicas e o tipo selvagem (controle) (FRAISIER et al., 2000). A fim de elucidar a existência de um mecanismo pós-transcricional no HATS em raízes de cana-de-açúcar, e se essa resposta ocorre em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) ou se é particularidade apenas na cultivar 'SP80-3280', foram utilizados outros genótipos que apresentaram diferenças na absorção de nitrato em outros trabalhos realizados no Laboratório de Melhoramento de Plantas (Informação pessoal, Dr. Joni Esrom Lima)[7]. Plantas das cultivares 'IAC87-3396' e 'IACSP96-2042', e ainda, 'SP80-3280' foram utilizados em experimentos de influxo rápido de ^{15}N-nitrato (Figura 13). Para isso, plantas dos três genótipos foram cultivadas em condições ótimas de N (+N; 2 mM NH_4NO_3) por 3 meses, sendo posteriormente submetidas a baixo N (0,2 mM de nitrato) por 7 dias. Após esse período, os três genótipos foram submetidos a tratamento com altas concentrações de nitrato de amônio, alto N (5 mM NH_4NO_3) (FRAISIER et al., 2000). As análises de influxo rápido de ^{15}N-nitrato na faixa de alta afinidade (0,2 mM) foram realizadas nos tempos 0 h, plantas em baixo N (0,2 mM de nitrato), 4 h e 24 h após a imposição do tratamento de para alto N (5 mM NH_4NO_3).

Os resultados de influxo de ^{15}N-nitrato demonstraram que quando as plantas ainda estavam sob baixo N (0h), 'IAC87-3396' apresentou maior aquisição de nitrato, seguido por 'IACSP96-2042' e 'SP80-3280' (Figura 13). Após 4 h de tratamento sob alto N, 'IAC87-3396 e 'IACSP96-2042' apresentaram redução significativa no influxo de ^{15}N-nitrato, enquanto que a cultivar 'SP80-3280' não mostrou alteração na absorção em suas raízes (Figura 13). Em relação aos tempos 0 e 4 h, os três genótipos apresentaram os menores níveis de absorção de nitrato marcado após 24 h de imposição de altas concentrações de nitrato de amônio (Figura 13). Portanto, as maiores diferenças no processo de aquisição de nitrato entre os genótipos avaliados ocorreram quando a concentração de N é baixa, o que demonstra a variação genética no processo de aquisição de nitrato entre híbridos de cana-de-açúcar. Os resultados indicam ainda a repressão do transporte de HATS sob provisão de alto N, similar ao que foi descrito em arabidopsis (FRAISIER et al., 2000; LAUGIER et al., 2012).

[7] Informação fornecida por J. E. Lima no CENA/USP em Piracicaba, em 2014.

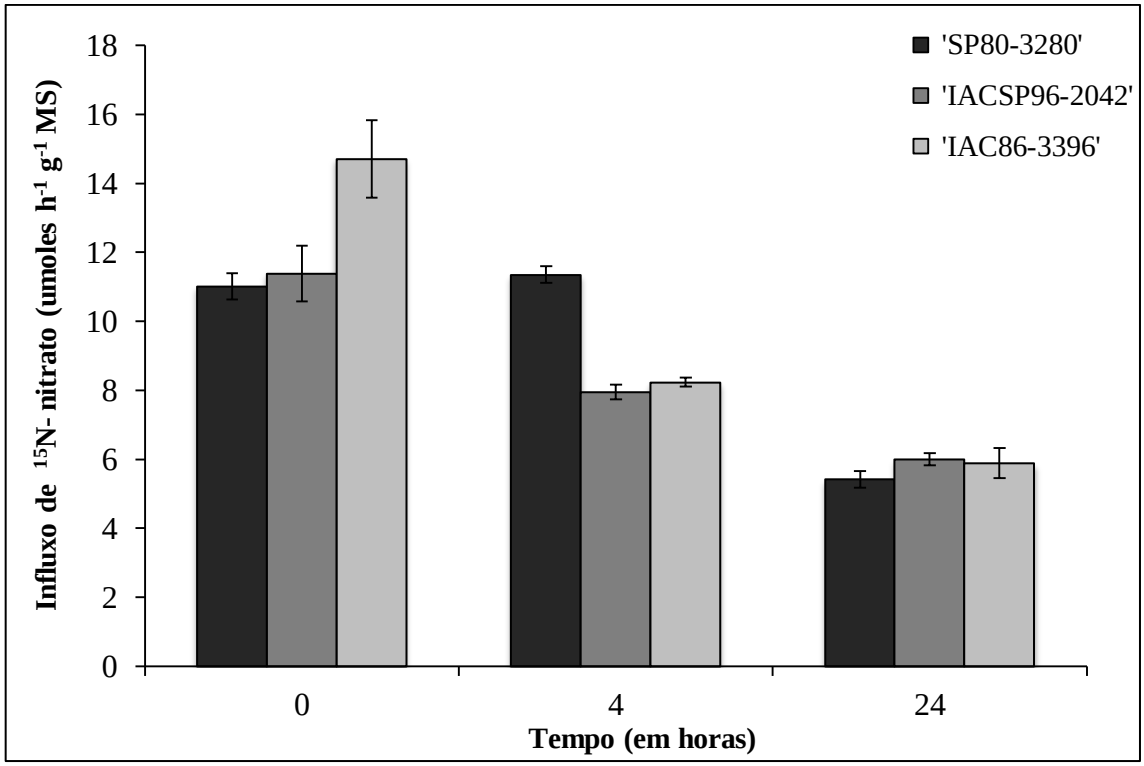


Figura 13: Regulação da aquisição de ^{15}N-nitrato em raízes dos genótipos de cana-de-açúcar contrastante para a aquisição de nitrato. Influxo de ^{15}N-nitrato em raízes dos genótipos 'IAC87-3396', 'IACSP96-2042' e 'SP80-3280' de cana-de-açúcar cultivadas em solução nutritiva. Estudos de influxo de ^{15}N-nitrato com concentração na faixa de alta-afinidade (0,2 mM) foram realizados em raízes de plantas cultivadas por 3 meses por 7 d em baixo N (0,2 mM de NO_3) como fonte única de N, e subsequentemente submetidas a tratamento de alto N (5 mM NH_4NO_3), sendo em seguida analisadas quanto ao influxo rápido de ^{15}N-nitrato (0,2 mM) nos tempo 4 e 24 h após provisão de N. Barras indicam ±SE, *n*= 5-6 réplicas biológicas.

Com o objetivo de correlacionar com influxo de ^{15}N-nitrato em raízes de cana-de-açúcar, foi verificado os níveis de expressão dos genes codificadores dos transportadores de alta-afinidade de nitrato por RT-qPCR (Figura 14). Diferenças nos níveis de expressão de genes relacionados ao transporte de HATS foram detectadas entre os genótipos de cana-de-açúcar avaliados. Para o gene *ScNRT2.1*, os maiores níveis de expressão foram detectados em raízes de 'IAC87-3396', seguido por, 'IACSP96-2042' e 'SP80-3280' 4 h após a imposição do tratamento de alto N (Figura 14A). A expressão de *ScNAR2.1* apresentou-se distinta entre os genótipos, sendo que 'IACSP96-2042' acumulou maiores níveis de transcritos, seguido por 'IAC87-3396' e 'SP80-3280' (Figura 14B). Portanto, semelhante ao influxo de nitrato em raízes (Figura 13), também foram detectadas variações na regulação de genes responsáveis pelo HATS (Figura 14A e B).

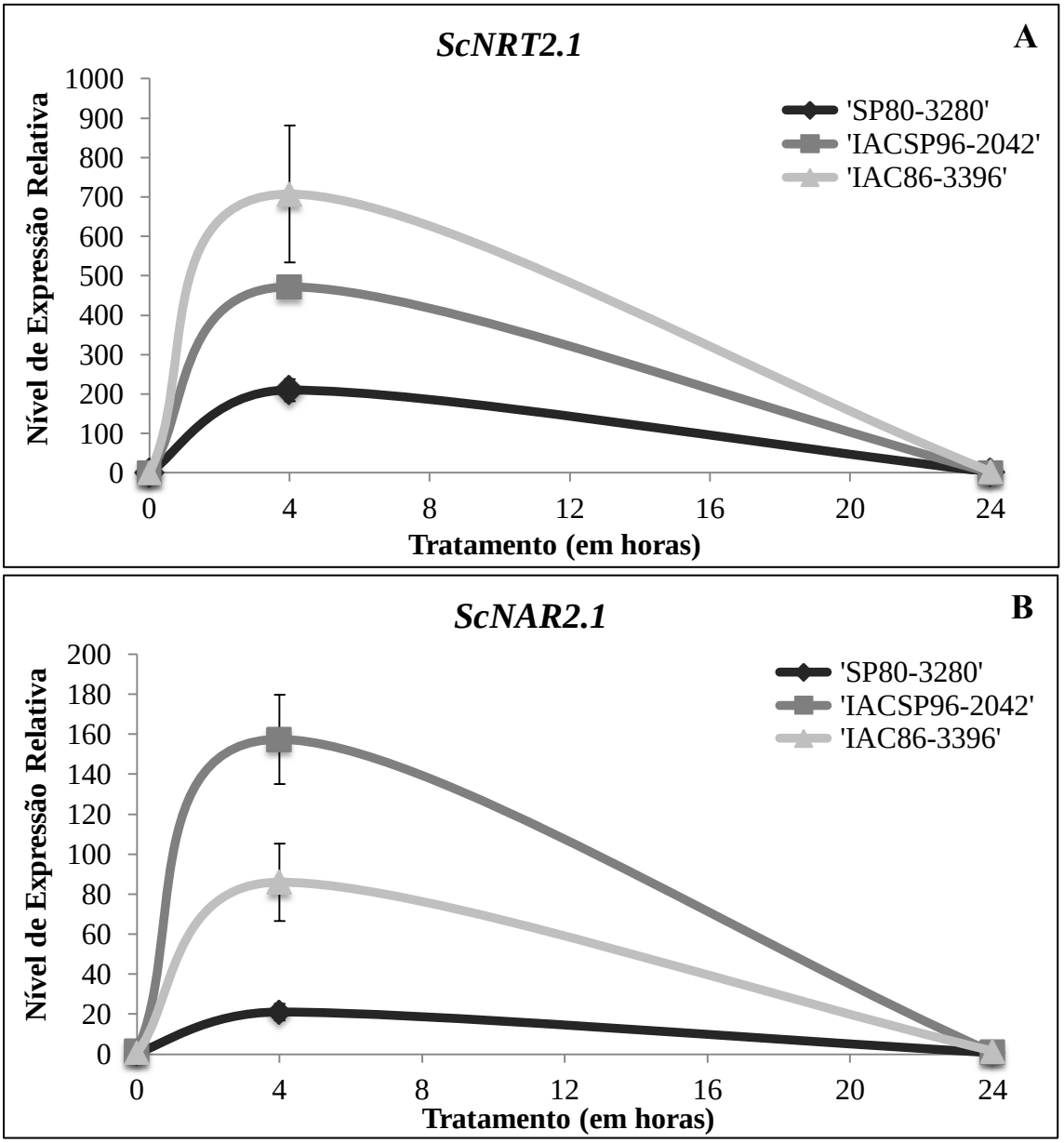


Figura 14 - Análise da expressão de genes que codificam transportadores de nitrato em genótipos de cana-de-açúcar contrastante para absorção de nitrato em raízes. Análise quantitativa de transcritos (RT-qPCR) dos genes envolvidos no transporte de nitrato na faixa de alta-afinidade *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* nas raízes dos genótipos 'IAC87-3396' (linhas verdes), 'IACSP96-2042' (linhas vermelhas) e 'SP80-3280' (linhas azuis) de cana-de-açúcar cultivadas em solução nutritiva por 3 meses e submetidas a tratamento de baixo N por 7 d (0,2 mM de NO_3), seguido de provisão de nitrato de amônio (5 m NH_4NO_3) durante 4 ou 24 h. Para este experimento o gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Os níveis de transcritos foram normalizados para raízes do genótipo 'IACSP96-2042'. O gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, *n*= 3 réplicas biológicas

Numa visão geral da regulação transcricional desses genes nos três genótipos de cana-de-açúcar avaliados nesse experimento em relação ao tempo 0 h, ou seja, cultivo em baixo N (0,2 mM NO_3^-) como fonte única de N, a expressão dos genes *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* foram

induzidas fortemente nos genótipos nas primeiras quatro horas de provisão de alto N (Figura 14). Em seguida, com 24 h de alto N, os níveis de expressão de *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* decaíram a níveis similares aos observados no tempo 0 h, com baixo N (Figura 14A e B). Apesar disso, o influxo de nitrato marcado é significativamente menor quando comparado a baixo N (tempo 0h) (Figura 13). Dessa forma, existe nos três genótipos a ausência de correlação entre expressão dos genes *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* e o influxo de ^{15}N-nitrato após a provisão de alto N, o que indica que a regulação transcricional de *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* não está diretamente relacionada com a inibição da atividade de HATS em raízes de cana-de-açúcar. Portanto, com base nos resultados obtidos nos genótipos de cana-de-açúcar avaliados em outra condição de cultivo, foi possível confirmar uma regulação pós-transcricional no transporte de HATS em raízes de cana-de-açúcar.

Recentemente, um mecanismo de regulação pós-transcricional envolvendo *NRT2.1* e *NAR2.1* foi identificado em raízes de arabidopsis. A superexpressão do gene *NRT2.1* por transgenia levou a maior acúmulo de transcritos desse gene quando submetido às altas concentrações de nitrato de amônio (LAUGIER et al., 2012). Comparado ao tipo selvagem na condição de 10 mM NH_4NO_3, apesar do maior acúmulo de transcritos de *AtNRT2.1*, mas não de *AtNAR2.1*, houve repressão do influxo de ^{15}N-nitrato, que foi seguido pelo menor acúmulo de proteínas *NRT2.1*, também nas raízes do transgênico (LAUGIER et al., 2012). Por outro lado, a análise do acúmulo de proteína *NAR2.1* utilizando anticorpo especifico detectou que plantas de arabidopsis cultivada sob alto N apresentam certa estabilidade dessa proteína, apesar da inibição no acúmulo de transcritos nessa condição e da diminuição do influxo de ^{15}N-nitrato (LAUGIER et al., 2012). Portanto, mesmo com a expressão constitutiva de *AtNRT2.1* não foi possível eliminar o efeito repressivo no transporte de HATS e ainda, *AtNAR2.1* não responde sempre de maneira similar a *AtNRT2.1* (LAUGIER et al., 2012). Esta evidência também foi previamente demonstrada no mutante de arabidopsis *nar2.1*, no qual o transcritos do gene *AtNRT2.1* foram detectados, mas não existe o acúmulo de proteína *NRT2.1* (WIRTH et al., 2007; YONG et al., 2010). Em resumo, estudos em arabidopsis demonstram que, apesar da interação em nível de proteínas destes dois componentes do transporte de alta afinidade (*AtNRT2.1* e *AtNAR2.1*), os padrões de expressão de ambos são independentes de acordo com o suplemento de N, visto que a variação na concentração de nitrato ou de nitrato de amônio exógeno leva a diferentes níveis de expressão de *NRT2.1* quando comparamos mutantes *nar2.1* e plantas selvagens (ORSEL et al., 2006), acarretando assim diferença na absorção de nitrato (LAUGIER et al., 2012).

Comparando-se com estudos utilizando arabidopsis e outras espécies, cana-de-açúcar apresenta comportamento distinto quanto à regulação do transporte de HATS em raízes. Em condições de indução de transporte de HATS em outras espécies, a adição exógena de nitrato em plantas pré-cultivadas sob deficiência de N levou a repressão da absorção de nitrato, enquanto, os genes *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* foram induzidos (Figura 11 e 12), sendo que para a maioria das espécies o influxo de nitrato acompanha a regulação desses gene (LEJAY et al., 1999; FILLEUR et al., 2001; ORSEL et al., 2006; LI et al., 2007; LAUGIER et al., 2012). Já em condições de repressão do transporte de HATS em outras espécies, a provisão de altas concentrações de nitrato de amônio, o influxo de ^{15}N-nitrato em cana-de-açúcar foi reprimido. No entanto, a expressão de *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* foi temporalmente induzida, sendo que era esperada uma repressão desses genes, como demonstrado para arabidopsis (YONG et al., 2010; LAUGIER et al., 2012). Apesar dessas diferenças, os resultados apresentados aqui indicam que, em ambas as condições de suplemento exógeno de N, cana-de-açúcar possui uma resposta defectiva no transporte de HATS, mediado pelo complexo proteico *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1*. No presente trabalho, não foi avaliado o acúmulo de proteína em raízes de cana-de-açúcar, porém, a regulação transcricional de *ScNAR2.1* parece diferir significativamente do que foi previamente reportado em outros trabalhos, visto que, a expressão de *AtNAR2.1* é reprimida sob condições de provisão de alto N (10 mM NH_4NO_3), enquanto que em cana-de-açúcar, *ScNAR2.1* foi induzidos nessas condições de cultivo. Ainda, dando suporte a essa afirmativa, na avaliação de três genótipos de cana-de-açúcar, apesar de terem sido observados maiores níveis de expressão de *ScNAR2.1* para 'IACSP96-2042' e 'IAC87-3396' quando comparado a 'SP80-3280' (Figura 14B), esse último genótipo apresentou menor efeito repressivo no influxo de ^{15}N-nitrato em suas raízes. Portanto, essas diferenças podem indicar que *ScNAR2.1* é o fator limitante na regulação de HATS para nitrato em raízes de cana-de-açúcar. No entanto, experimentos funcionais precisam ser realizados para comprovação desses resultados.

Estes dados evidenciam a presença de um mecanismo de regulação pós-transcricional dos transportadores de alta-afinidade em raízes de cana-de-açúcar, semelhante ao observado em arabidopsis, envolvendo ambos os genes *NRT2.1* e *NAR2.1* (LAUGIER et al., 2012) em condições de alto N, mas distinto em condições de suplementação exógena de nitrato após pré-tratamento de deficiência de N. A identificação desse processo pode ser um dos mecanismos responsáveis pela baixa eficiência na aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar quando comparado a outras espécies (ROBINSON et al., 2011). Nas condições de cultivo no campo, o uso de fertilizantes a base de N, na forma de ureia e nitrato de amônio, é

uma pratica comum utilizada para aumentar a produtividade de cana-de-açúcar (WOOD et al., 2010) e o processo de regulação pós-transcricional no transporte de HATS em cana-de-açúcar afetaria a aquisição de nitrato nas raízes dessa gramínea.

4.2 Caracterização do processo de remobilização de nitrato em raízes de cana-de-açúcar

A senescência é um processo ativo e programado que ocorre durante o desenvolvimento das plantas no quais tecidos dreno que realizam fotossíntese e anabolismo tornam-se tecidos fonte, realizando catabolismo (BUCHANAN-WOLLASTON, 1997; GAN; AMASINO, 1997; HORTENSTEINER; FELLER, 2002). Durante a senescência, nutrientes ficam disponíveis para serem transportados para outros tecidos da planta (HORTENSTEINER; FELLER, 2002), contribuindo assim, por meio do processo de remobilização, para reciclagem, resultando consequentemente na maior eficiência no uso de nutrientes (HIREL et al., 2007). A relação entre a produtividade de plantas cultivadas e senescência foi postulada há muitos anos com base na premissa de que um período prolongado de atividade fotossintética máxima, ou seja, o atraso senescência, pode levar a níveis mais elevados de produtividade (THOMAS; STODDART, 1980). Por outro lado, a indução do processo de senescência pode ocorrer em condições de baixos níveis de nutrição mineral, em especial nitrogênio. A deficiência de N leva a uma maturação antecipada devido à senescência acelerada, afetando gravemente os níveis de produtividade de culturas (EGLI et al., 1976; EGLI, 2011). Tal efeito foi demonstrado em experimentos onde a remoção de folhas-dreno em canola, soja e trigo levou ao atraso na senescência e, portanto, diminuição na taxa de remobilização de N (PATTERSON; BRUN, 1980; CRAFTS-BRANDNER; EGLI, 1987; NOQUET et al., 2004; LEMAÎTRE et al., 2008; HTWE et al., 2011). Logo, o processo de remobilização requer uma estreita sincronização entre a formação de dreno e senescência do tecido fonte (GAN; AMASINO, 1997; LEMAÎTRE et al., 2008).

Em condições de restrição de N, o processo de remobilização de N disponibiliza esse nutriente mediante alterações em nível celular (SCHULZE et al., 1994; LEMAÎTRE et al., 2008). Proteínas foliares, mais precisamente proteínas Rubisco e clorofilas contidas nos plastídeos, são degradadas por ação de proteases e processo de autofagia durante a senescência, fornecendo grande quantidade de N para suplementar órgãos em crescimento, como folhas jovens e sementes (FELLER et al., 2008; ISHIDA et al., 2008; WADA et al., 2009; KATO et al., 2010; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Curiosamente, o

processo de autofagia não causa lise dos cloroplastos, mas é regulada pelo *status* de carbono na folha (STETTLER et al., 2009; IZUMI et al., 2010), o que demonstra um relação direta entre o processo de remobilização de N e o metabolismo de C.

Em várias plantas cultivadas, o processo de remobilização de N tem sido demonstrado como fundamental para reciclagem de N e, portanto, da manutenção da produtividade. Estudos utilizando traçadores ^{15}N indicam que a remobilização de N a partir de folhas de arroz, milho, canola e trigo constitui 50 a 90% do N total em grãos, sendo fundamental para a produtividade destas plantas cultivadas (HIREL et al., 2001; MARTIN et al., 2005; MALAGOLI et al., 2005; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Para estas espécies cultivadas, o N remobilizado é essencial para a produção de sementes e produtividade, sendo este nutriente adquirido principalmente durante a fase vegetativa de desenvolvimento e não durante a fase reprodutiva (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). Evidências desta regulação da aquisição de nitrato de acordo com o desenvolvimento da planta vêm da inibição deste processo em raízes de canola durante a fase reprodutiva, a qual é acompanhada pela redução nos níveis de expressão do gene *BnNRT2.1* em raízes, responsável pela aquisição de nitrato na faixa de alta afinidade (MALAGOLI et al., 2004; BEUVE et al., 2004). Similar redução na absorção de nitrato na faixa de alta afinidade foi observada em milho e arabidopsis (COQUE; GALLAIS, 2007, CHARDON et al., 2010). Portanto, para essas espécies, a capacidade de adquirir e estocar N durante a fase vegetativa reflete diretamente na produtividade de grãos e sementes durante a fase reprodutiva (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010).

Em contraste, cana-de-açúcar difere dessas outras plantas cultivadas, pois objeto final de produção agrícola dessa gramínea é o acúmulo de biomassa vegetativa e não grãos (MUCHOW et al., 1994; BELL et al., 2010). Como consequência, as características de maior aquisição e armazenamento de N para posterior utilização em processos de remobilização para produção de biomassa durante o ciclo da cultura devem ocorrer ainda durante o início do desenvolvimento (MUCHOW et al., 1996; ROBINSON et al., 2009). Apesar do conhecimento gerado em torno do processo de remobilização de N em plantas cultivadas para produção de grãos, o conhecimento sobre a fisiologia durante a remobilização de N em cana-de-açúcar não tem sido abordado. Considerando a baixa capacidade de absorver e estocar nitrato nos tecidos previamente identificada em cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011), fica evidente a necessidade de identificar o mecanismo pelo qual essa forma inorgânica de N pode ser afetada durante o processo de remobilização em condições contrastantes de disponibilidade de N.

Estudos sobre remobilização de N têm sido realizados em várias espécies por meio da determinação da quantidade total deste nutriente presente em diversos órgãos e tecidos nos vários estágios de crescimento, seja vegetativo ou reprodutivo, e também pelo fluxo de ^{15}N após longa exposição à fonte de N marcado (GALLAIS et al., 2006; COQUE et al., 2008; CHARDON et al., 2010). Com a intenção de caracterizar o processo de transporte de nitrato na parte aérea de cana-de-açúcar, foi realizado um experimento de translocação/remobilização *in vivo* utilizando concentrações equimolares de $^{15}N\text{-}NO_3^-$ e $^{15}N\text{-}NH_4^+$ (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010; MASCLAUX-DAUBRESSE; CHARDON, 2011). Para isso, plantas de cana-de-açúcar foram crescidas e cultivadas durante três meses em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) Em seguida, um grupo de plantas foi colocado em solução contendo $^{15}NH_4NO_3$, enquanto o outro grupo foi colocado em solução contendo $NH_4{}^{15}NO_3$, para de identificar se o fluxo de nitrato difere de amônio durante o processo de remobilização. O tempo de exposição à fonte de ^{15}N foi de 48 h para ambos os grupos. Considerando que o processo de remobilização de N é desencadeado sob condições de limitação N (SCHULZE et al., 1994; LEMAÎTRE et al., 2008), após a exposição à fonte de ^{15}N, as plantas foram submetidas à deficiência de N (-N) ou a alto N (5 mM de NH_4NO_3) e a análise de ^{15}N acumulado foi realizado em nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d após o tratamento com N-marcado. Para cada tratamento amostras de raízes, colmo, folhas maduras (+3) e folhas recém expandidas (+1) foram analisadas com o objetivo de avaliar o fluxo de derivados de ^{15}N em condições contrastantes de disponibilidade de N.

Para identificar se às condições contrastantes de N as quais plantas de cana-de-açúcar foram submetidas foi eficaz, a análise da concentração total de N foi realizada nos diversos tecidos/órgãos de cana-de-açúcar (Figura 15). Em raízes, com apenas 1 d de exposição aos tratamentos, houve diferença significativa na concentração de N. Neste período, a restrição de N levou a uma queda de 20% na concentração em relação às plantas encontradas em suficiência de N (+N; 0 d) (Figura 15A). No mesmo período, plantas sob alto N, apresentaram concentração de N 10% maior em relação às plantas analisadas no período 0 d (Figura 15A). A diferença na concentração de N em raízes entre as plantas submetidas a condições contrastantes de suplemento em raízes aumentou significantemente nos períodos subsequentes avaliados (Figura 15A). As raízes de plantas cultivadas sob alta concentração exógena de N apresentaram aproximadamente 30% mais N total após 5 d do que quando comparado a raízes de plantas no período 0 d (Figura 15A). Contrariamente, durante a restrição de N, a concentração de N caiu em mais de 40% nas raízes (Figura 15A), e após 10 d de exposição a

condições contrastantes de disponibilidade de N, a diferença na concentração de N total em raízes de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 70% entre os tratamentos, evidenciando que estes foram efetivos.

Em colmo, a exposição à disponibilidade contrastantes de N por 1 d não foi capaz de causar diferenças na concentração de N total neste órgão (Figura 15B). No entanto, após 5 e 10 d de tratamentos, houve diferenças significativas na concentração total de N nos colmos entre os tratamentos. Comparado a plantas submetidas à alta concentração de N, foi observado um decréscimo significativo de aproximadamente 25% e 40% na concentração de N nesse órgão após 5 e 10 d respectivamente, em plantas sob restrição de N (Figura 15B). Portanto, a limitação de N afetada drasticamente a concentração de N total em colmos de cana-de-açúcar a partir de 5 dias.

Em folhas de cana-de-açúcar, pode-se observar uma manutenção na concentração de N total entre os tratamentos de provimento deste nutriente, visto que houve menor variação em relação a raízes e colmo nos períodos analisados (Figura 15C e D). Em folhas jovens, recém-expandidas (+1), não houve diferença significativa na concentração de N total nos períodos de 1 e 5 d após exposição aos tratamentos. Somente após 10 d de exposição a condições contrastantes de N foi possível observar diferença significativa na concentração. Enquanto a concentração de N permaneceu inalterada em plantas colocadas sob alto N, plantas com restrição apresentaram uma queda de aproximadamente 20% na concentração de N total, quando comparadas ao primeiro período analisado (0 d) (Figura 15C). Padrão semelhante no conteúdo de N foi o observado em folhas maduras (+3), sendo que, após 10 d de cultivo em condições limitantes de N, a concentração deste nutriente diminuiu significativamente em 20%; enquanto que a exposição a alta concentração de N não alterou a concentração de N em folhas maduras em relação ao início do experimento (Figura 15D). Esses resultados indicam que os tratamentos contrastantes de disponibilidade de N foram efetivos para alterar a homeostase de N nos órgãos de cana-de-açúcar.

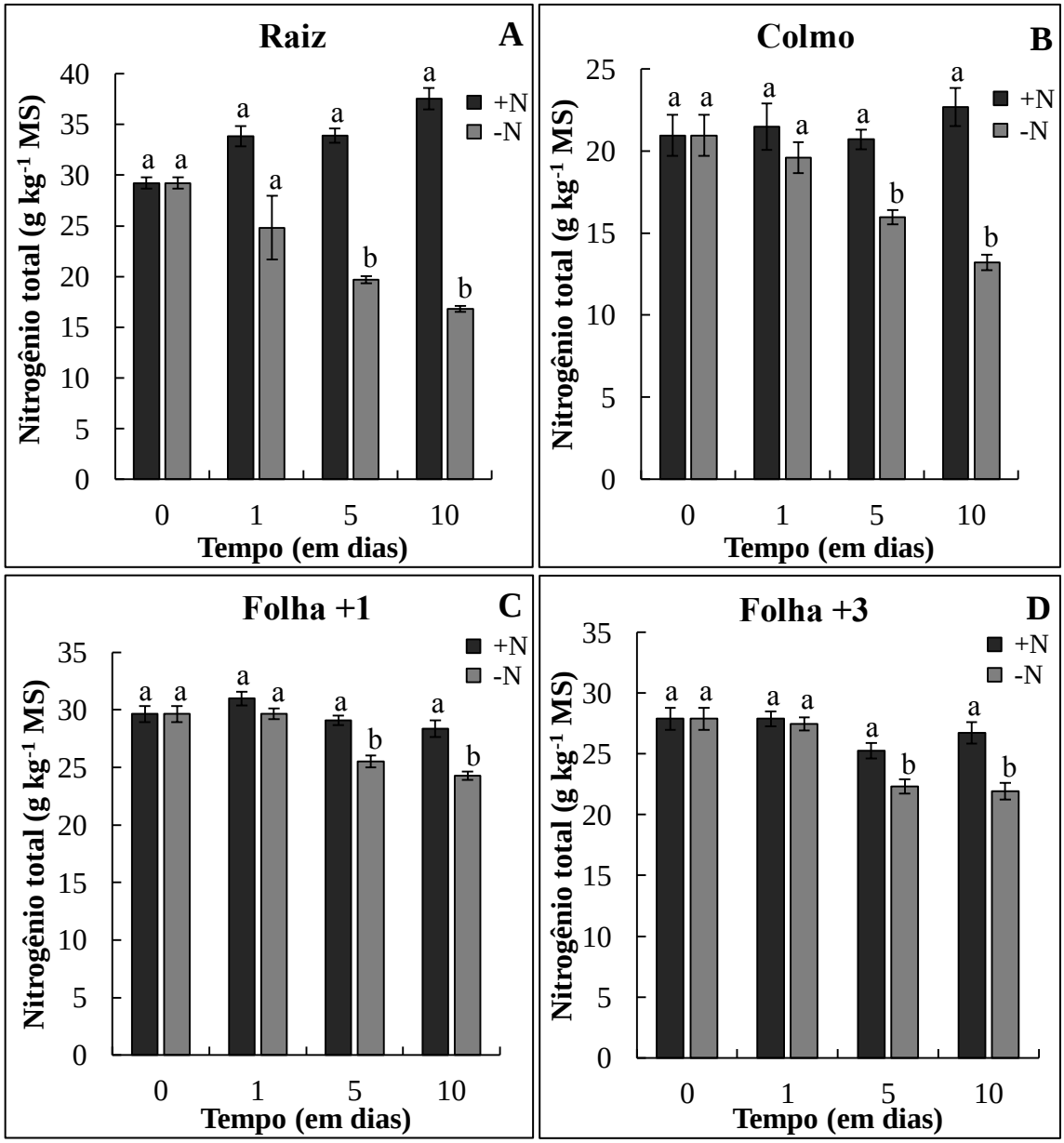


Figura 15: Concentração de N nos diversos órgãos-tecidos de plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram submetidas à deficiência de N (-N) ou a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de raízes, colmo, folhas maduras (+3) e folhas recém-expandida (+1) foram coletadas e analisados nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d quanto a concentração de N. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os horários amostrados pelo teste de Scott-Knott a 5%, *n*=4.

Após verificar a efetividade dos tratamentos de disponibilidade contrastantes de N, foi realizado um novo experimento com concentrações equimolares de ^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio para de verificar se fontes inorgânicas de N são diferencialmente remobilizadas mediante as condições contrastantes de disponibilidade deste nutriente.

No período inicial (0 d), a concentração de ^{15}N-nitrato (1186,11 μg g^{-1} MS) foi 4,5 vezes menor do que a concentração de ^{15}N-amônio observada no mesmo período (5303,02 μg g^{-1} MS) (Figura 16), confirmando a reduzida capacidade de aquisição de nitrato quando comparado a amônio em raízes de cana-de-açúcar (Figura 6 e ROBINSON et al., 2011). Apesar dessa diferença na absorção de nitrato e amônio, o fluxo de ambas as fontes de N-marcado das raízes para outros órgãos foi semelhante em ambas às condições de N, considerando o decréscimo significativo na concentração de ^{15}N em raízes ao longo do período avaliado (Figura 16). Por outro lado, diferenças foram identificadas quanto à concentração de ^{15}N para as fontes inorgânicas de N mediante a disponibilidade exógena de N. Plantas marcadas com ^{15}N-nitrato apresentaram redução significativa de aproximadamente 50% na concentração de ^{15}N em raízes sob alto N, enquanto que a limitação de N levou a manutenção de níveis constantes de ^{15}N-nitrato após 1 d de tratamento. Diferente do observado anteriormente não foi observada diferença entre as condições contrastantes de N quanto ao fluxo de ^{15}N-nitrato após 5 e 10 d de imposição do tratamento, apesar da queda em relação ao período anterior (1 d) na concentração de ^{15}N (Figura 16A). Para plantas marcadas com ^{15}N-amônio, uma queda significativa foi observadas em ambos os tratamentos de N logo após 1 d de exposição. Todavia, a concentração de ^{15}N-amônio foi em torno de 15% menor sob limitação de N quando comparado a condição de alto N (Figura 16B). Nos tempos subsequentes, foi observada uma inversão, sendo que raízes de plantas cultivadas em condições limitantes de N apresentaram aproximadamente 37% e 57% mais ^{15}N-derivado de amônio após 5 e 10 d, respectivamente, quando comparado a alto N nos respectivos períodos (Figura 16B). Numa comparação direta entre nitrato e amônio, os experimentos de N-marcado em raízes de cana-de-açúcar indicam que o transporte/alocação dessas fontes inorgânicas de N é diferencialmente regulado durante a limitação de N, visto que o fluxo de ^{15}N-nitrato não apresenta regulação rápida (1 d) quando comparado a ^{15}N-amônio (Figura 16), sugerindo que nitrato ou ^{15}N-derivado de nitrato permanecem em raízes em condições de restrição de N por períodos curtos, o que pode indicar menor carregamento de nitrato no xilema nessas condições. Ou seja, apesar da diferença na regulação do processo de remobilização entre as fontes marcadas, fica evidente que o fluxo de ^{15}N derivado de nitrato ou de amônio para outros órgãos é menor durante a deficiência de N (Figura 16).

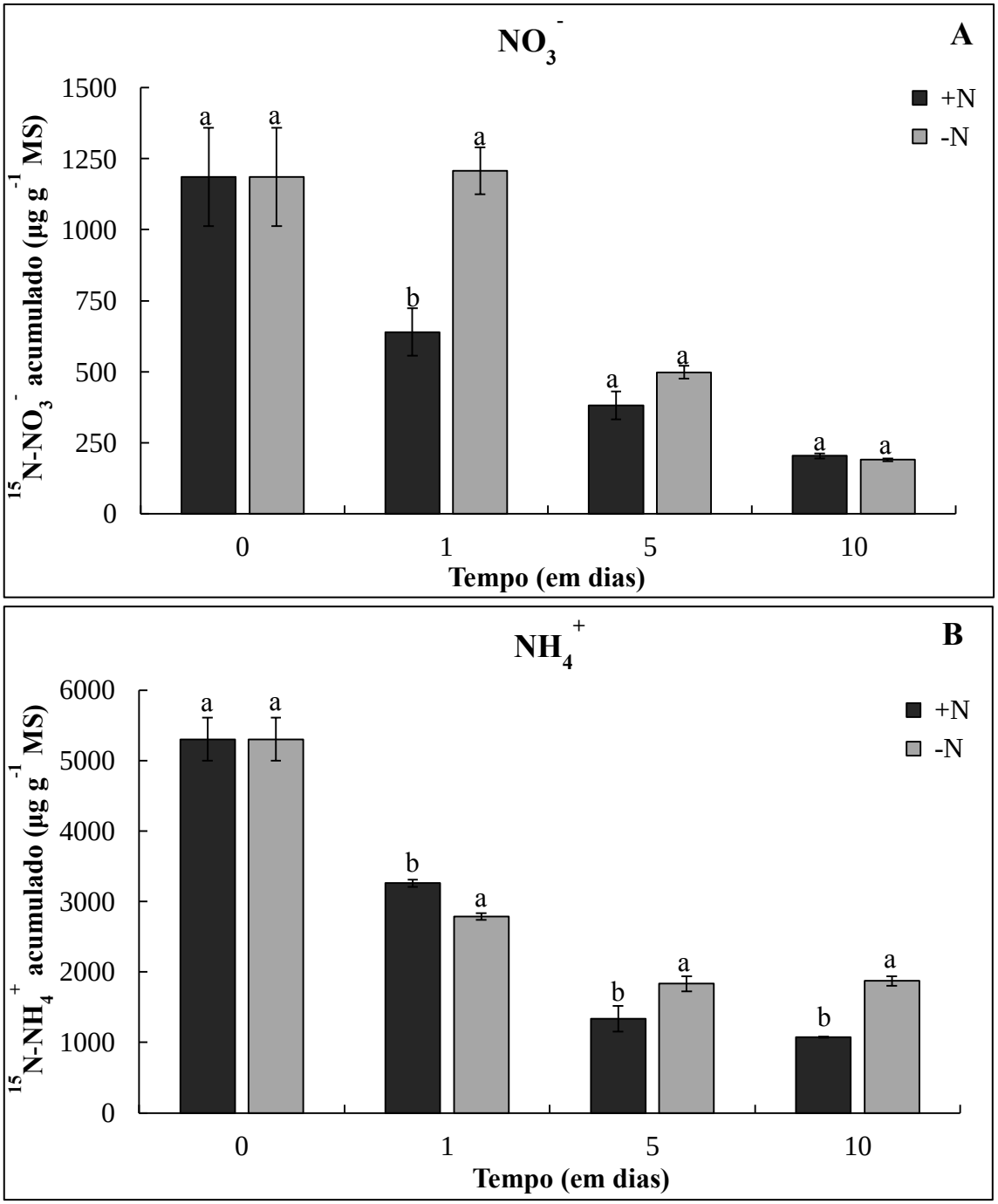


Figura 16 - Concentração de ^{15}N em raízes de plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram colocadas em solução contendo N-marcado (^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio, ambas a 1 mM de N) por 48h. Após este tratamento, foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de raízes foram coletadas e analisadas para a concentração de ^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os horários amostrados pelo teste Scott-Knott a 5%, *n*= 4

Baseado nos resultados de ^{15}N em raízes é esperado um menor fluxo de ^{15}N-nitrato para a parte área de cana-de-açúcar quando comparado a ^{15}N-amônio. Os resultados em colmo, porém, não demonstram isso (Figura 17). Após 1 d de restrição de N, a concentração de ^{15}N-nitrato em colmo se manteve constante; diferente do que foi observado em plantas submetida a alta concentração de N, nas quais a concentração de N derivado de nitrato diminuiu aproximadamente 40% em relação ao primeiro período amostrado (0 d) (Figura 17A). Nos demais períodos analisados (5 e 10 d) não houve diferenças significativas na concentração de ^{15}N-nitrato entre os tratamentos de disponibilidade de N. A concentração de derivados de ^{15}N-amônio no colmo em condições contrastantes de disponibilidade de N foi quantificada (Figura 17B). Após 1 d de tratamento, plantas submetidas a restrição de N tiveram concentração de ^{15}N-amônio 25% maior quando comparadas a plantas sob alto N (Figura 17B). A diferença na concentração de N-marcado entre os tratamentos de disponibilidade de N foi crescente, atingindo após 10 d uma concentração 50% maior em plantas sob restrição de N, quando comparadas com plantas submetidas a alta concentração de N (Figura 17B). Ou seja, em plantas submetidas a alta concentração de N, a concentração de ^{15}N-amônio em colmo foi menor quando comparada a plantas sob restrição deste nutriente. Portanto, a análise das concentrações de ^{15}N derivado de nitrato e de amônio em condições contrastante de disponibilidade de N permite concluir que em colmo ocorre alocação/remobilização de N para nitrato e amônio, ou seus produtos de assimilação. Em plantas submetidas à limitação de N, o processo de alocação/remobilização de N é menor para ambas as fontes inorgânicas de N e com isso, esse órgãos passa atuar como dreno de N ao invés de fonte de N como observado em condições de ampla disponibilidade de N (Figura 17).

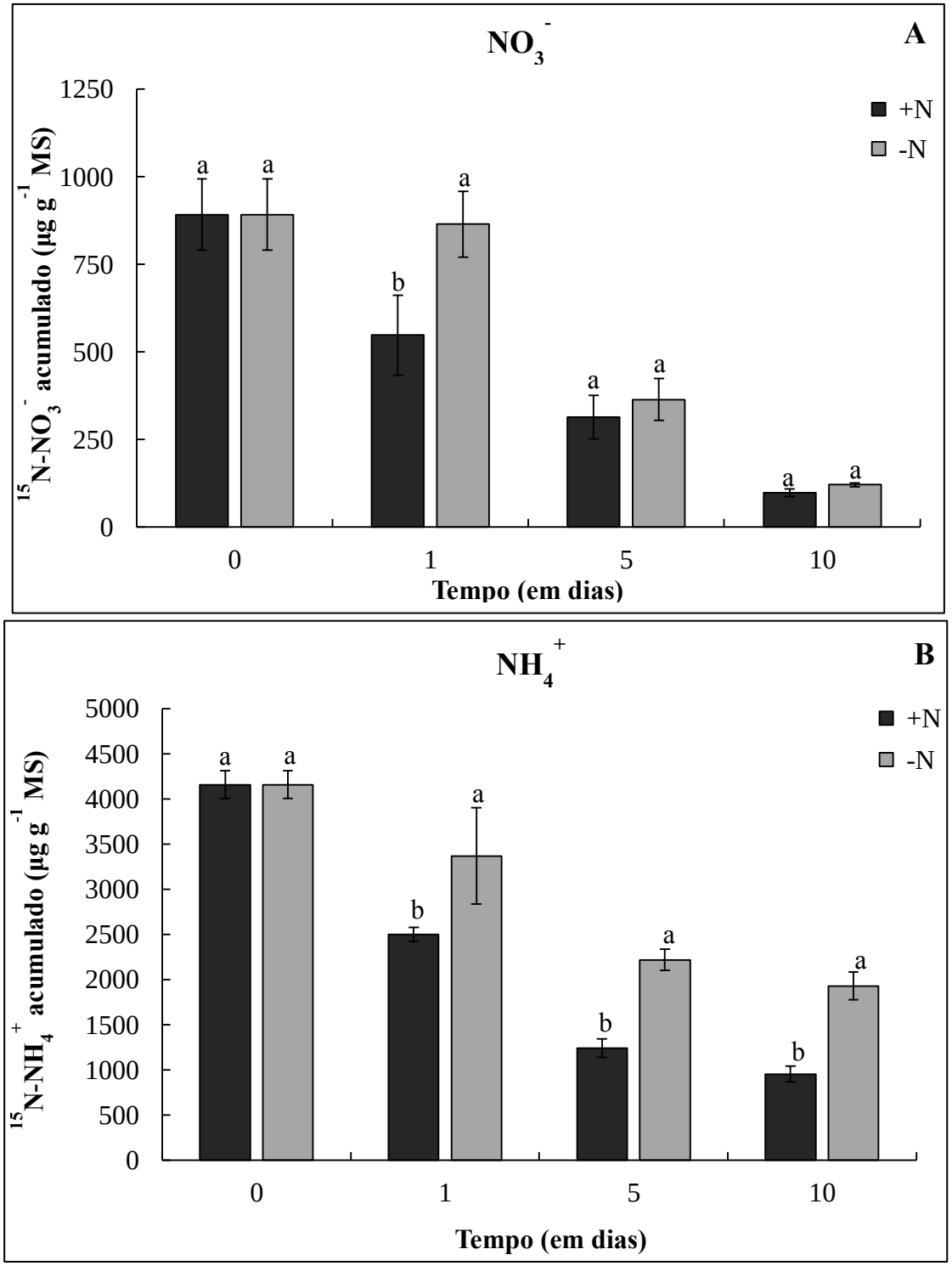
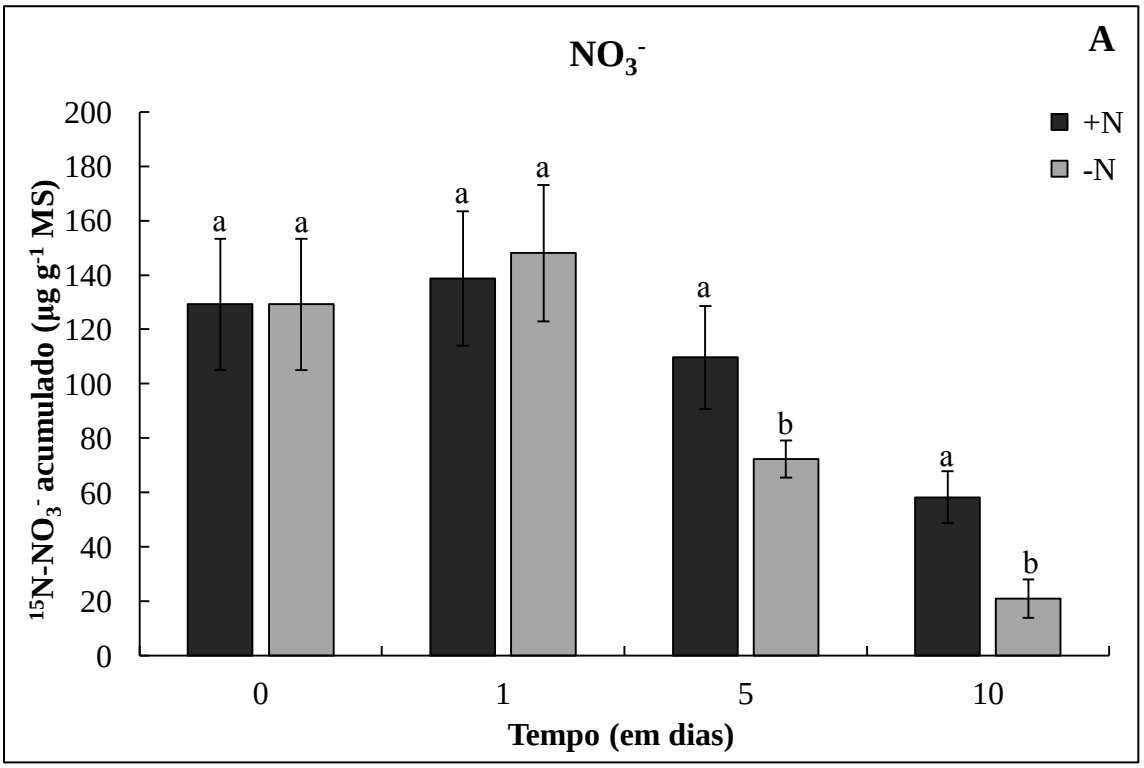


Figura 17: Concentração de ^{15}N em colmo de plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N, 2 mM de NH_4NO_3) foram transferidas para solução contendo N-marcado (^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio, ambas a 1 mM de N) por 48h. Após este período, as plantas foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de colmo foram coletadas e analisadas para concentração de ^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os horários amostrados pelo teste Scott-Knott a 5%, *n*= 4

A análise da concentração de ^{15}N acumulado para fontes inorgânicas de N em folhas demonstrou um padrão distinto. Folhas maduras (+3) apresentaram um decréscimo significativo nas concentrações de ^{15}N-nitrato seja em condições de cultivo com amplo suplemento de N (alto N; +N) ou em condições limitantes de N (-N) (Figura 18A). Para plantas cultivadas em alto N (+N) o decréscimo de ^{15}N-nitrato foi menor do que para folhas maduras de plantas sob deficiência de N (-N), o que sugere que ^{15}N-nitrato, ou seus derivados do metabolismo de N, estão sendo remobilizados mais fortemente em condições de limitação de N, principalmente a partir de 5 e 10 d de tratamento. Ou seja, o N acumulado na forma de nitrato atua como fonte de N em folhas maduras (Figura 18A). Em contraste, a análise de ^{15}N-amônio em folhas maduras de cana-de-açúcar indica que o transporte dessa fonte inorgânica de N não ocorre em condições de suficiência de N (alto N; +N), mas ocorre em condições de baixa disponibilidade de N (-N), considerando que em amplo suplemento de N (alto N; +N) a concentração de ^{15}N-amônio é pouco variável ao longo do tempo (Figura 18B). Porém, sob deficiência de N houve queda significativa na concentração de ^{15}N em folhas maduras logo após 1 d de restrição, permanecendo em níveis similares nos tempos subsequentes, 5 e 10 d (Figura 18B). Esses resultados indicam que em folhas maduras de cana-de-açúcar (+3), o transporte de nitrato difere do transporte de amônio de acordo com a disponibilidade exógena de N. O nitrato é alocado/remobilizado para outros órgãos independentemente da demanda de N da planta, enquanto que o amônio é remobilizado estritamente em condições de limitação exógena de N (Figura 18).



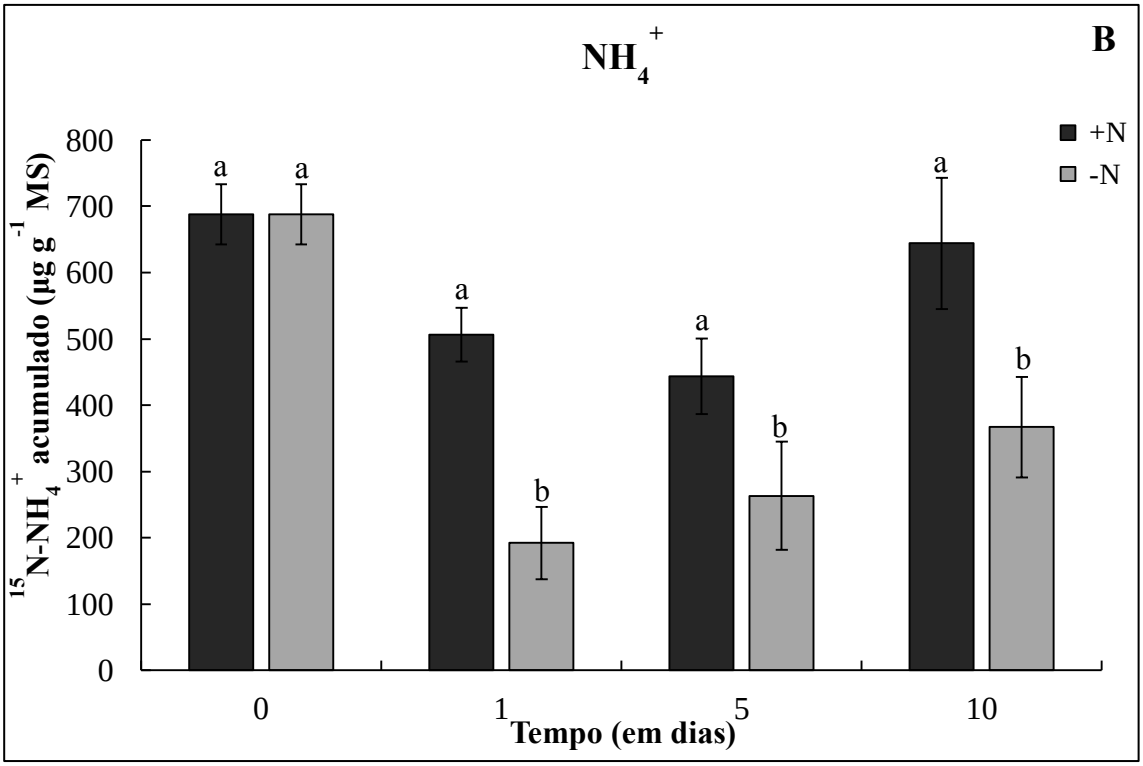
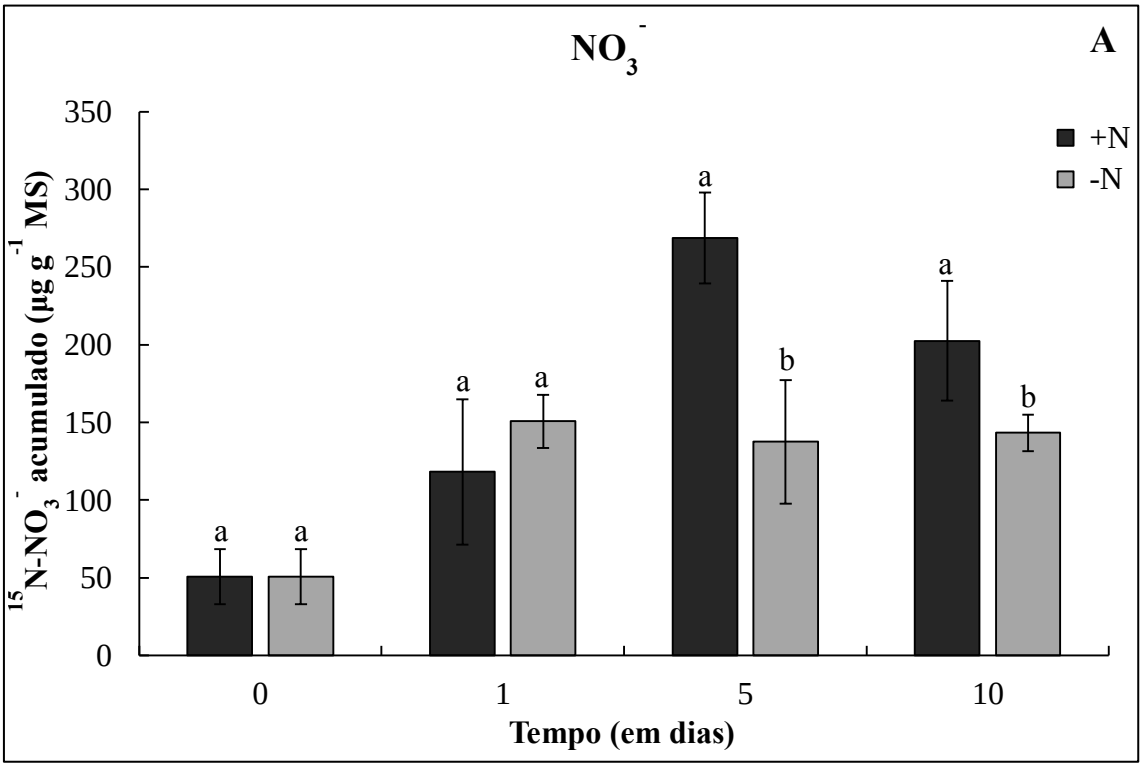


Figura 18 - Concentração de ^{15}N em folhas maduras (+3) de plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram transferidas para solução contendo N-marcado (^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio, ambas a 1 mM de N) por 48h. Após este tratamento, as plantas foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de folha madura (+3) foram coletadas e analisadas para a concentração de ^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os horários amostrados pelo teste Scott-Knott a 5%, *n*= 4.

Diferentemente do que foi observado para folhas maduras (+3), as folhas jovens (+1) atuam restritamente como dreno para N (Figura 19). Com base nas análises de ^{15}N acumulado fica evidente que o fluxo de ambas a fontes de N, nitrato e amônio marcado, que aumentam drasticamente nos períodos avaliados (Figura 19). Plantas cultivadas em ^{15}N-nitrato, apresentam níveis similares de ^{15}N acumulado com 1 e 5 d, independente do status de N da planta (Figura 19A). Em condições de alto suplemento de N, 5 d após o tratamento, foram observados os valores máximos de ^{15}N acumulado, permanecendo a níveis similares com 10 d (Figura 19A). A deficiência de N (-N), por sua vez, levou a redução significativa no transporte de N marcado para as folhas jovens. A concentração de ^{15}N-nitrato ou seus produtos da assimilação foi menor após 5 e 10 d de tratamento, em relação a observada inicialmente (0 d), o que sugere que durante a limitação de N ocorre um fluxo menor de ^{15}N-nitrato para folhas jovens quando comparado a condição de alto N (+N) (Figura 19A).

O fluxo de ^{15}N-nitrato difere do fluxo de ^{15}N-amônio para folhas jovens de cana-de-açúcar (Figura 19B). Com base na concentração de ^{15}N-amônio foi possível observar uma regulação temporal no acúmulo de ^{15}N, visto que em condições de ampla disponibilidade exógena de N (alto N; +N), ocorre um aumento crescente ao longo dos tempos avaliados (Figura 19B). Com 1 d de limitação de N (-N) não foi observado fluxo de ^{15}N-amônio para folhas jovens, permanecendo com valores ^{15}N acumulado significativamente menores do que em condição de suficiência de N (+N). No entanto, após 10 d de tratamento, a concentração de ^{15}N-amônio e/ou seus derivados são maiores em condições de deficiência de N quando comparado a condições de amplo suplemento de N (alto N, +N) (Figura 19B). Com base nesses resultados é possível sugerir que folhas jovens são os principais órgãos-dreno de N durante a fase vegetativa do desenvolvimento da cana-de-açúcar. Além disso, a análise de fluxo de ^{15}N indica que nitrato, ou produtos de sua assimilação, são preferencialmente transportados para folhas jovens em condições de amplo status de N (alto N), mas não em condições limitantes desse nutriente. Já amônio, e/ou seus produtos da assimilação, é transportado para esses órgãos-dreno independente do status de N da planta; porém, durante a deficiência de N, folhas jovens de cana-de-açúcar tornam-se um forte dreno para ^{15}N-amônio quando comparado a ^{15}N-nitrato (Figura 19).



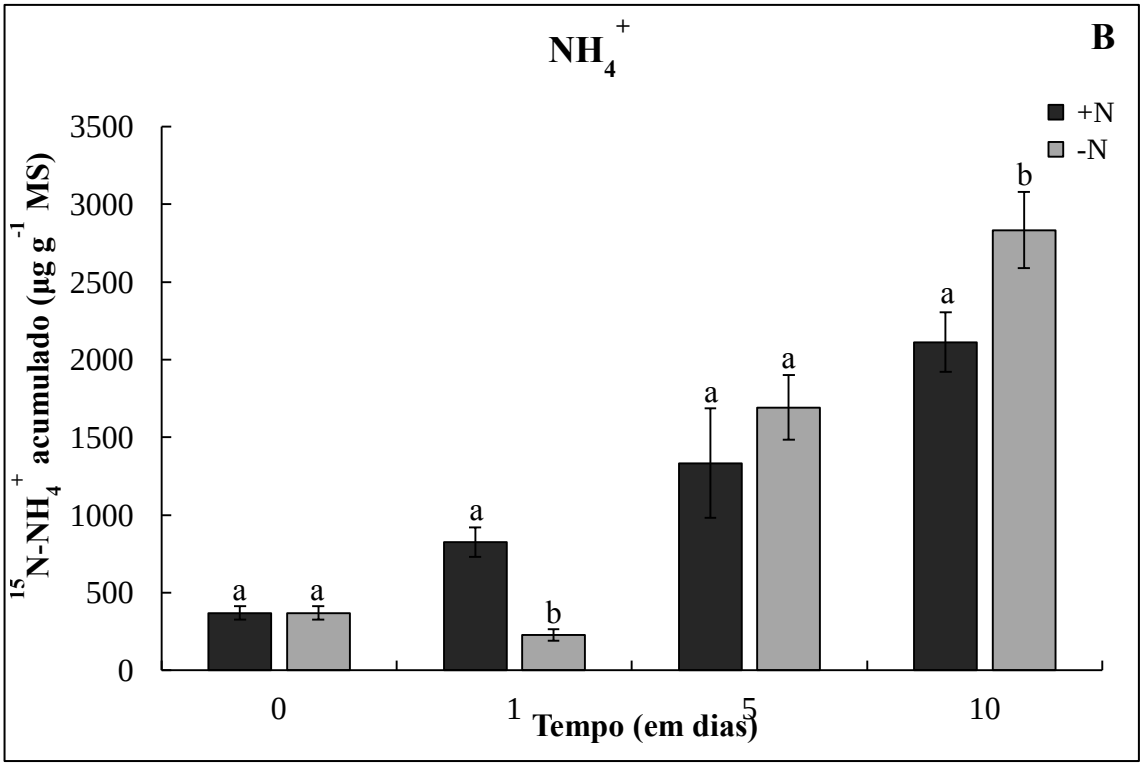


Figura 19: Concentração de ^{15}N em folhas recém-expandidas (+1) de plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram transferidas para solução contendo N-marcado (^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio, ambas a 1 mM de N) por 48 h. Após este tratamento, as plantas foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de folhas recém expandidas (+1) foram coletadas e analisadas para a concentração de ^{15}N-nitrato ou ^{15}N-amônio nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Letras diferentes indicam que as médias diferem significativamente entre os horários amostrados pelo teste Scott-Knott a 5%, *n*= 4.

Os resultados de análise de fluxo de nitrato ou amônio marcado demonstram que a concentração de nitrato relativo a amônio é significantemente menor em todos os tecidos/órgãos de cana-de-açúcar analisados, sendo em raízes 4,4 vezes menor , em colmo 4,6, folhas maduras, 5,3 e folhas jovens 7,4 vezes (Figuras 16, 17, 18 e 19), confirmando a discriminação de nitrato durante o processo de absorção de N em raízes e a menor capacidade de estocar nitrato nos tecidos de cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011). Apesar de ser menos estocado em tecidos de cana-de-açúcar, os resultados apresentados aqui demonstram que nitrato, assim como amônio, é transportado entre órgãos em condições de alto N e remobilizado em condições limitantes de N (Figuras 16, 17, 18 e 19), assim como descritos para outras espécies vegetais (MASCLAUX et al., 2001; MARTIN et al., 2005; UAUY et al., 2006; CHARDON et al., 2010).

Mas as diferenças no processo de alocação e remobilização de nitrato comparado a amônio foram evidenciadas. Para melhor visualização, o fluxo de ^{15}N em cada órgão-tecido, de acordo com a fonte de N-marcado e com o status de N da planta, foi calculado com base na porcentagem absoluta de ^{15}N para cada fonte inorgânica de N (Figura 20). Plantas cultivadas em condições de amplo suplemento de N (+N) apresentaram o fluxo de ^{15}N-nitrato principalmente para raízes e folhas jovens, com cerca de 36% de ^{15}N acumulado após 10 d de cultivo (Figura 20). Por outro lado, a remobilização de ^{15}N-nitrato foi quebrada em plantas cultivadas sob condições de restrição de N (-N), considerando o maior fluxo de ^{15}N derivado de nitrato para as raízes, com 39 %, e para colmos, 25% (Figura 20). O ^{15}N remobilizado é de origem de folhas jovens e folhas maduras, com base na redução no percentual de ^{15}N acumulado quando comparado a condições de alto N (Figura 20). Assim, com o maior percentual apresentado em raízes e colmos em relação ao tratamento de alto N, pode-se dizer que, durante a deficiência de N, o nitrato é remobilizado principalmente para estes órgãos de cana-de-açúcar.

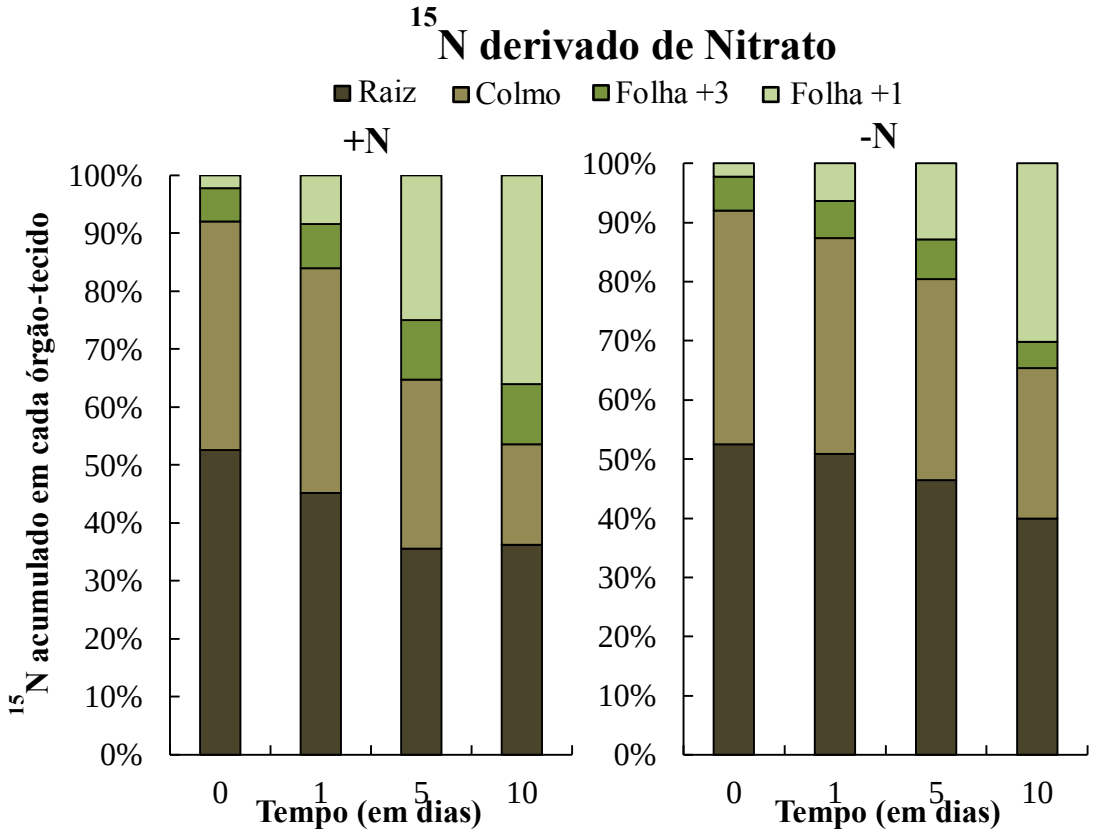


Figura 20 - Fluxo de ^{15}N-nitrato em cada órgão-tecido plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Cálculo da participação percentual de ^{15}N feito em relação à concentração da fonte marcada total obtida em cada tratamento e período analisado.

Para amônio, um padrão distinto de acúmulo de ^{15}N acumulado foi identificado (Figura 21) quando comparado ao observado com nitrato (Figura 20). Plantas cultivadas sob alto N apresentaram, após 10 d de tratamento, maior porcentagem de ^{15}N-amônio ou seus produtos de assimilação, principalmente em folhas jovens, com 43% (Figura 21), seguido por menor acúmulo em raízes e colmos de cana-de-açúcar, com 22 e 19% respectivamente (Figura 21). Apesar da alta porcentagem de ^{15}N em raízes e colmo em plantas sob deficiência de N, ambos com 26%, o fluxo maior de ^{15}N ainda permaneceu para folhas jovens, nas quais houve um decréscimo de 6% no ^{15}N acumulado quando comparado à condição de suficiência de N (alto N). Portanto, a restrição de N levou ao menor fluxo de ^{15}N principalmente para folhas maduras, visto o decréscimo de 3% significativo de ^{15}N acumulado para amônio, em relação ao observado no tempo 0 d (Figura 21), confirmando os resultados de concentração absoluta de ^{15}N-amônio (Figura 18B).

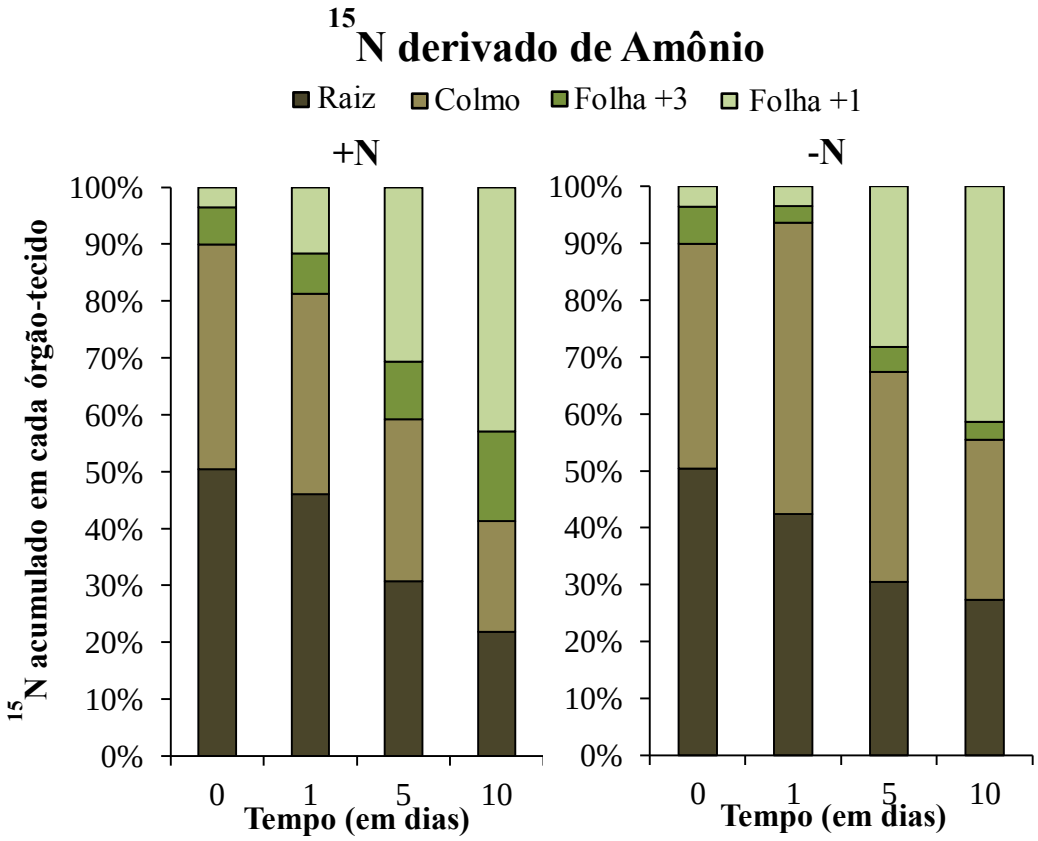


Figura 21 - Fluxo de ^{15}N-amônio em cada órgão-tecido plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Cálculo da participação percentual de ^{15}N feito em relação à concentração da fonte marcada total obtida em cada tratamento e período analisado.

A comparação direta entre as fontes inorgânicas de N indica que nitrato, similar a amônio, é utilizado como fonte de N em folhas jovens em condições amplas de suplemento de N. No entanto, em condições de deficiência de N, nitrato tem maior fluxo para raízes e colmos enquanto que amônio ainda permanece com fonte de N em folhas jovens (Figuras 20 e 21). Considerando que o aumento nos níveis celular de amônio pode causar toxidez (BRITTO; KRONZUCKER, 2002), é possível sugerir que, quando absorvido pelas raízes, o amônio esta sendo metabolizado em aminoácidos, visto que experimentos utilizando ^{15}N-amônio em raízes em cana-de-açúcar identificaram que a maioria do ^{15}N é incorporada aos aminoácidos glutamina e asparagina em raízes em cana-de-açúcar (BIGGS, 2003). Ainda, a identificação de altas concentrações de ^{15}N na forma de glutamina e glutamato em folhas de cana-de-açúcar demonstram que essas formas orgânicas de N são transportadas via xilema para a parte-aérea (BIGGS, 2003, ROBINSON et al., 2014). A assimilação de amônio em glutamina e asparagina indica que as enzimas GS (glutamina sintetase), GOGAT (glutamato sintase) e AS (aspargina sintetase) estão em atividade em raízes de cana-de-açúcar, assim como para maioria das espécies (LEA; MIFLIN, 2011). No entanto, não explica os altos níveis de ^{15}N-nitrato identificados principalmente em raízes e colmo de cana-de-açúcar, sendo que era esperado a assimilação de forma inorgânica de N. Diferentemente de amônio, a assimilação de nitrato requer a redução dessa forma de N pela enzima nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) para subsequente atividade do complexo GS/GOGAT. Portanto, a atividade de NR poderia ser o fator limitante para a redução dessa forma inorgânica de N em raízes e colmo de cana-de-açúcar. De fato, a atividade de NR é cerca de 2 vezes menor em raízes quando comparado a folhas de cana-de-açúcar (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967; De ARMAS et al., 1992), o que demonstra que folhas são os principais órgãos responsáveis pela redução e assimilação de nitrato. Isso explicaria os maiores níveis de ^{15}N derivado do nitrato identificados em raízes e colmo de cana-de-açúcar (Figuras 16A e 17A), assim como previamente identificados os altos níveis de nitrato no xilema de plantas cultivadas sob altas concentrações providas de nitrato (RANJITH, 2007), e também as altas concentrações de nitrato em raízes e xilema de plantas cultivadas em solução nutritiva, ambos comparados às folhas (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967, De ARMAS et al., 1992). Apesar disso, a interpretação que a NR é o fator limitante na redução de nitrato em raízes e colmo de cana-de-açúcar requer mais estudos considerando que plantas de cana-de-açúcar cultivadas no campo apresentam baixas concentrações de nitrato em seus órgãos independente da disponibilidade exógena N (BIGGS, 2003, ROBINSON et al., 2014). Além disso, a maior atividade de NR

em folhas não está diretamente correlacionada com a maior eficiência no uso de nitrato, visto que a atividade de NR em folhas de ancestrais de cana-de-açúcar, *S. spontaneum* e *Erianthus* se assemelham ao milho (ROBINSON et al., 2014). Entretanto, essas espécies possuem baixa habilidade de utilizar nitrato como fonte N, assim como cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011). Ainda, a baixa atividade de NR em raízes e colmo de cana-de-açúcar pode ser devido a regulação por amônio e ainda por carbono (SCHEIBLE et al., 1997a; 1997b; LILLO, 2008), o que indicaria que nitrato estaria disponível como fonte inorgânica de N em raízes e colmos de cana-de-açúcar.

Com base nessas considerações é possível sugerir que diferentemente de nitrato, amônio é assimilado rapidamente em tecidos/órgãos de cana-de-açúcar. Isso difere de outras plantas cultivadas ou ainda de arabidopsis. Ensaios com ^{15}N-nitrato com arabidopsis indicam que a maior parte do ^{15}N é incorporado na biomassa e na síntese de proteínas, mas não são estocados em vacúolos (COQUE; GALLAIS, 2007; COQUE et al., 2008; DIAZ et al., 2008; MASCLAUX-DAUBRESSE; CHARDON, 2011). Os experimentos de ^{15}N apresentados aqui sugerem ainda que, sob deficiência de N o fluxo de nitrato é preferencialmente para raízes e colmos de cana-de-açúcar e que nessas condições o transporte durante a remobilização de N é distinto de amônio, o que indica que o transporte de nitrato para folhas é reduzido quando plantas estão sob condições de restrição de N (Figura 22).

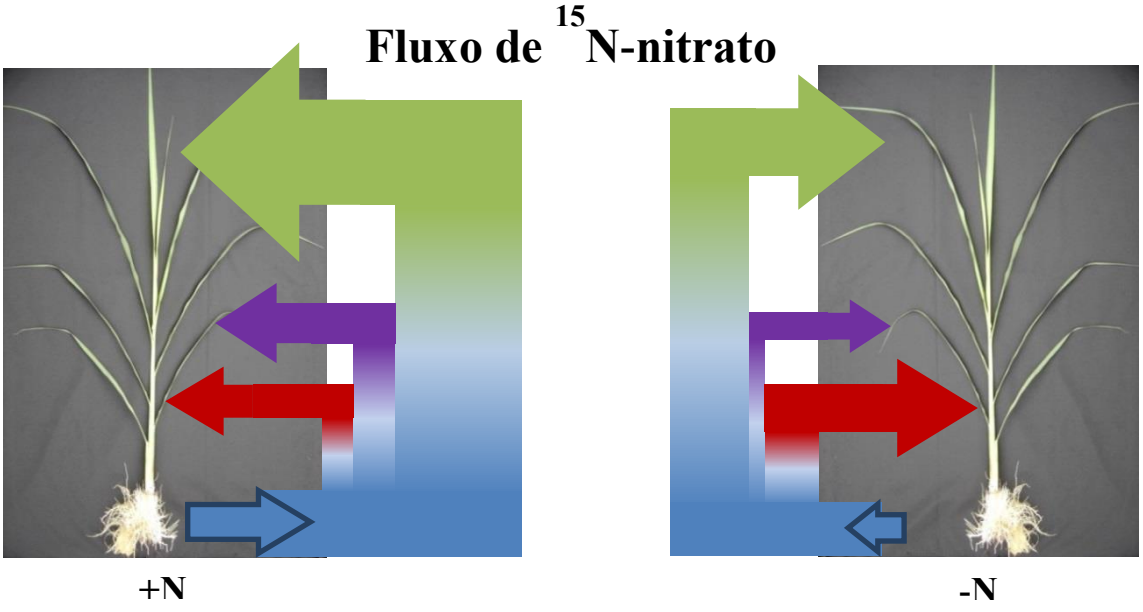


Figura 22 - Representação esquemática da partição de ^{15}N-nitrato em plantas de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de N

A aquisição e transporte de nitrato entre tecidos/órgãos é mediado por proteínas transmembrana pertencente a família multigênica *NRTs* (TSAY et al., 2007; GOJON et al., 2009; DECHORGNAT et al., 2011). Para melhor compreensão da regulação da homeostase de nitrato identificada nos experimentos de ^{15}N-nitrato em plantas de cana-de-açúcar cultivadas em condições contrastantes de disponibilidade de N, análises de expressão relativa dos principais genes de transportadores de nitrato previamente relacionados com função fisiológicas aos processos de absorção, translocação e assimilação foram realizadas nas condições dos experimentos descritos acima.

Os transportadores de baixa afinidade *ScNRT1.1* e de alta afinidade *ScNRT2.1* e *ScNAR2.1* são essenciais na aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar. A expressão do transportador *ScNRT1.1* foi rapidamente regulada sob deficiência de N (-N), apresentando o dobro de transcritos acumulados quando comparado a condição de cultivo sob alto N, após 1 d de tratamento (Figura 23A). Aos 5 d de tratamento, a expressão de *ScNRT1.1* ainda permanece maior em condições restritas de suplemento de N (-N) em comparação a alto N. No tempo subsequente (10 d), no entanto, os níveis de transcritos aumentam em plantas cultivadas em alto N igualando aos níveis de expressão em condições de deficiência de N (-N) (Figura 23A). Esses resultados sugerem que *ScNRT1.1* estaria ativamente realizando a aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar sob deficiência de N.

O complexo de proteínas transportadoras de alta-afinidade a nitrato também apresentaram regulação em nível transcricional mediante as condições contrastantes de disponibilidade de N oferecidas no experimento. Nos tempos avaliados, *ScNRT2.1* apresentou acúmulo de transcritos de 2,6 vezes apenas 1 d após a limitação de N, seguido pela redução da sua expressão nos tempo 5 e 10 d de tratamento exógeno de N (Figura 23C). Por outro lado, a indução de *ScNRT2.1* em condições de alto N foi observado estritamente após 10 d de cultivo. Já a expressão de *ScNAR2.1* não acompanhou a regulação de *ScNRT2.1*, visto que os níveis de acúmulo de *ScNAR2.1* decresceram significantemente ao longo do períodos avaliados em raízes de plantas cultivadas sob limitação de N (-N). Enquanto isso, sob alto N (+N), a expressão de *ScNAR2.1* aumentou a partir de 1 d, e atingiu os máximos de valores de transcritos acumulados em 10 d de suplemento exógeno de N (+N) (Figura 23D). Esses resultados sugerem que durante a deficiência de N (-N), o complexo de transporte de alta-afinidade pode estar ativo; no entanto, os maiores níveis de expressão *ScNRT2.1* sugerem que esse transportador é o principal responsável pelo maiores níveis de ^{15}N-nitrato identificado em raízes de cana-de-açúcar após 1 d de deficiência de N (-N) (Figura 23C). Portanto, pode-se concluir que o transporte de alta-afinidade composto por dois componentes, *ScNRT2.1* e

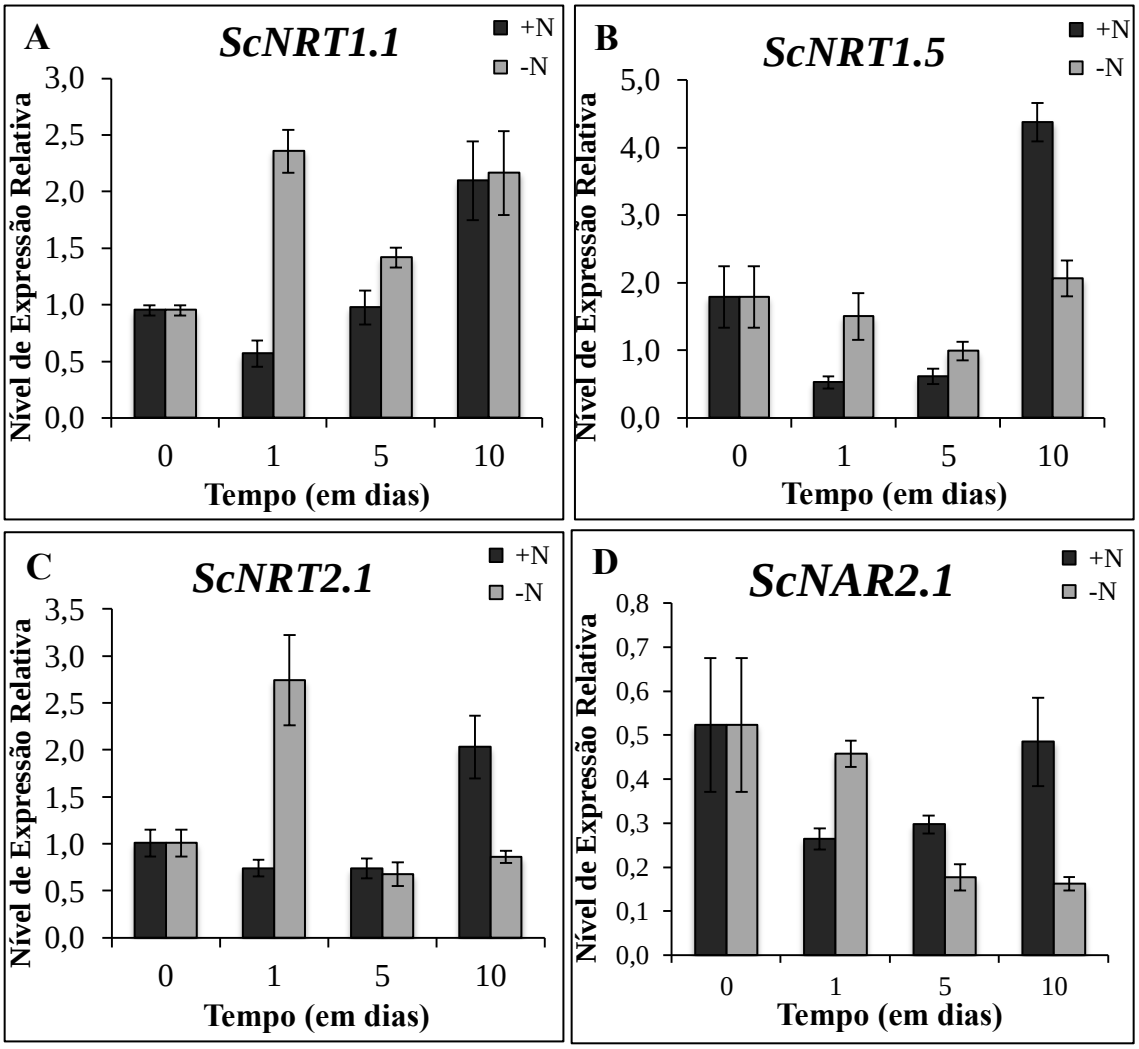
ScNAR2.1, é ativo e regulado diferencialmente, sendo funcional inicialmente em raízes de plantas sob restrição de N e tardiamente em plantas em alto N.

Recentemente, *AtNRT2.5* foi identificado como sendo um importante transportador de nitrato em raízes e folhas (LEZHNEVA et al., 2014). Em condições de longo períodos de deficiência de N, *AtNRT2.5* é expresso em células da epiderme e pelos radiculares realizando o transporte constitutivo de tipo HATS, e na parte-aérea, *AtNRT2.5* é localizado no sistema vascular, sendo responsável pelo transporte de nitrato armazenado nos vacúolos da bainha do feixe e células do mesofilo da folha em plantas de arabidopsis (LEZHNEVA et al., 2014; KOTUR; GLASS, 2014). A análise de expressão do ortólogo identificado em cana-de-açúcar indica que *ScNRT2.5* é restritamente regulado em condições limitantes de N em raízes de cana-de-açúcar (Figura 23E). Nestas condições, esse gene apresentou acúmulo de 4 vezes de transcritos logo após 1 d de tratamento, e se manteve com níveis de 2,4 e 2 vezes mais expressos aos 5 e 10 d após tratamento quando comparado a alto N (+N) (Figura 23E). Portanto, a regulação de *ScNRT2.5* indica que esse gene possivelmente atua na aquisição de nitrato na faixa de concentração de alta-afinidade em raízes de cana-de-açúcar sob deficiência de N e que a regulação temporal diferenciada quando comparado aos genes *ScNRT2.1*/*ScNAR2.1* sugerem que *ScNRT2.5* é ativo em condições de longo períodos de limitação de N (Figura 23C, D e E). Função similar foi recentemente descrita aos ortólogos de arabidopsis e milho (LEZHNEVA et al., 2014, KOTUR; GLASS, 2014).

Em resumo, os principais transportadores de LATS e HATS apresentam regulação temporal em raízes de cana-de-açúcar submetidas a longos períodos de condições contrastantes de disponibilidade de N. Enquanto *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1* foram rapidamente regulados de forma transiente sob deficiência de N (-N), *ScNRT2.5* manteve altos níveis de transcritos em raízes cultivadas sob condições limitantes de N. Ainda, a regulação tardia em particular de *ScNRT1.1* e *ScNRT2.1* sob alto suplemento exógeno de N indica que a aquisição de nitrato responde a uma sinalização distinta de demanda N, o que sugere que existe uma variação na absorção de nitrato mesmo quando cana-de-açúcar é cultivada sob alta concentrações de nitrato. Evidências de variação no transporte de HATS e LATS foram identificadas em estudos em campo com canola (MALAGOLI et al., 2004) ou em estudos durante todo o ciclo de vida de plantas de milho (GARNETT et al., 2013), no qual, foi identificado que a variação na aquisição de nitrato corresponde principalmente a ação de genes de alta-afinidade, como *NRT2.1*. Apesar de não ter sido realizada a análise de influxo

de nitrato em raízes de cana-de-açúcar durante longos períodos de tratamento de N, o resultados apresentados aqui sugerem regulação similar em raízes de cana-de-açúcar.

Para o nitrato ser transportado para a parte aérea da planta, esse tem que ser carregado para dentro dos vasos do xilema da raiz. Em arabidopsis, o transportador *AtNRT1.5*, expresso em células do periciclo vizinhas ao protoxilema, está envolvido no carregamento de nitrato no xilema (LIN et al., 2008). Mutante no gene *AtNRT1.5* apresenta reduzida capacidade de transportar nitrato da raiz para parte aérea, demonstrando a função fisiológica desse gene no carregamento do xilema (LIN et al., 2008). A análise de expressão *ScNRT1.5* em raízes de cana-de-açúcar não identificou a regulação desse gene sob condições de deficiência de N (Figura 23B), o que sugere que o carregamento do xilema é inibido ou mantido a níveis basais em condições de limitantes de N. No entanto, sob alto N, a expressão *ScNRT1.5* foi induzida tardiamente após 10 d imposição de alto N (Figura 23B), indicando a participação desse gene no carregamento do xilema em células da raízes de cana-de-açúcar apenas quando N é suplementado sob altas concentrações.



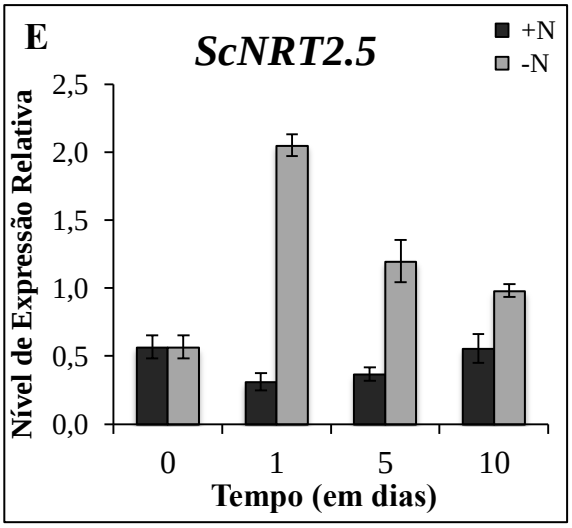


Figura 23: Análise quantitativa de transcritos reversos *NRTs* (*NITRATE TRANSPORTERS*) em raízes de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de raízes foram coletadas nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Para as análises de expressão, o controle utilizado (normalizador) foi a média dos valores de expressão gênica obtidos para o tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH_4NO_3, tempo 0 h). O gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, *n*= 4-5 plantas por tempo amostrado.

Considerando a alta concentração de ^{15}N-nitrato em colmo de cana-de-açúcar cultivada sob limitação de N (Figura 17A), aliado a ausência de regulação de *ScNRT1.5* em raízes sob privação de N é possível especular que: 1) os maiores níveis de nitrato em colmo podem ser devido ao estoque dessa fonte inorgânica de N neste órgão, para ser remobilizado em condições de deficiência de N; ou 2) a atividade basal da proteína *ScNRT1.5* em condições limitante de N seja suficiente para o carregamento de nitrato em células do xilema; 3) outros transportadores de nitrato da família *NRT* poderiam estar realizando o carregamento de nitrato no xilema em raízes de cana-de-açúcar.

Considerado que *NRT1.5* é membro do família LATS e o ortólogo em arabidopsis possui K_m de 6 mM, a atividade dessa proteína de membrana pode ser suficiente no transporte de nitrato da raiz da parte aérea de cana-de-açúcar. Outra possibilidade é a participação de outros transportadores da família *NRT* no carregamento do xilema. Recentemente dois outros transportadores de baixa afinidade foram funcionalmente correlacionados com o transporte de nitrato da raiz para a parte-aérea. Os genes *NRT1.8* e *NRT1.9* são expressos em células do parênquima do xilema e células companheiras do floema em raiz; mutantes nesses genes em arabidopsis possuem alteração no transporte de nitrato da raiz para a parte aérea (LI et al., 2010; WANG; TSAY, 2011). Portanto, é possível que outros membros da família *NRT1*

estejam realizando o transporte de nitrato em raízes de cana-de-açúcar sob condições limitantes de N (-N). Infelizmente a identificação e a avaliação da regulação desses genes ainda permanecem por serem estabelecidas em cana-de-açúcar.

A compreensão sobre a regulação *ScNRT1.5* em colmos de cana-de-açúcar pode ser importante para elucidar se o nitrato presente ou armazenado nesse órgão, como evidenciado nos experimentos de ^{15}N-nitrato, está sendo carregando em células do xilema do colmo, sendo direcionado para as folhas. Para melhor compreensão, a análise da expressão gênica de *ScNRT1.5* também foi conduzida em colmo de plantas de cana-de-açúcar sob as diferentes condições de disponibilidades de N (Figura 24). Diferente do que foi observado em raízes, a expressão de *ScNRT1.5* em colmo de cana-de-açúcar foi induzida sob deficiência de N (-N). Após 1 d de exposição aos tratamentos, foi possível observar que a expressão do *ScNRT1.5* foi induzida 1,4 vezes em relação a 0 d. Nos períodos subsequentes analisados, o gene *ScNRT1.5* foi induzido ainda após 5 e 10 d de deficiência de N em relação ao tempo inicial (Figura 24). Por outro lado, em colmos de plantas cultivadas sob alto N (+N), a expressão de *ScNRT1.5* aumentou significativamente apenas após 10 d de tratamento exógeno de N, apresentando repressão transiente nos primeiros períodos avaliados (Figura 24). Esses resultados indicam uma regulação diferencial de *ScNRT1.5* sob deficiência de N em raízes e colmos de cana-de-açúcar, e que possivelmente os maiores valores de ^{15}N-nitrato identificados nos experimentos de fornecimento de ^{15}N-nitrato (Figura 17A) são possivelmente decorrentes da ação dessa proteína de membrana, realizando o carregamento de nitrato no xilema do colmo de cana-de-açúcar. Além disso, esses resultados oferecem a base molecular para justificar os maiores níveis de nitrato no xilema identificados em plantas, sendo elas cultivadas sob altas concentrações exógenas de nitrato (BIGGS, 2003; RANJITH, 2007) ou em experimentos de solução nutritiva que apresentaram maiores concentrações de nitrato em raízes e no xilema quando comparado a folhas (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967; De ARMAS et al., 1992). O fato que *ScNRT1.5* é diferencialmente regulado em raízes e colmo de cana-de-açúcar indicam que esse gene obedece a sinalizações distintas nesses órgãos. Os reguladores desse gene em colmo e raízes ainda permanecem por serem investigados, mas com os resultados apresentados aqui é possível inferir que o nitrato está sendo remobilizado a partir de células do colmo, possivelmente. O nitrato estocado em vacúolos de células parenquimáticas do colmo estaria sendo carregado para o xilema mediante a sinalização de baixo N, ou ainda, em condição de alto N, porém de forma tardia (Figura 17A). Isso explicaria a baixa capacidade de estocar nitrato previamente identificada em cana-de-açúcar (ROBINSON et al., 2011), sendo que a atividade da proteína

transmembrana *ScNRT1.5* provê o carregamento de nitrato tanto em alta quanto em baixa disponibilidade de N.

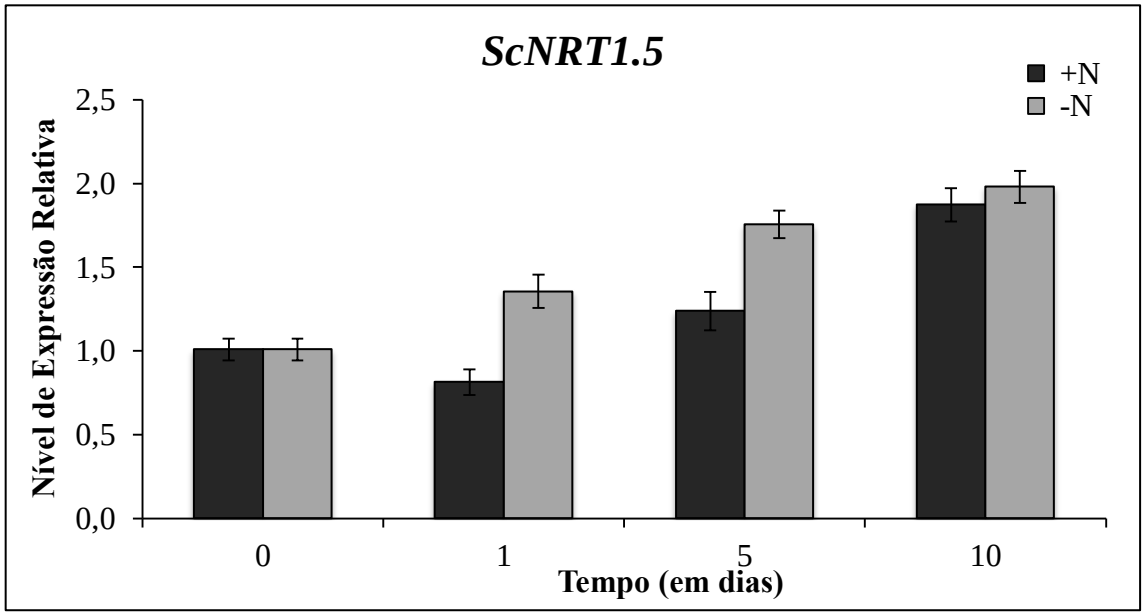


Figura 24 - Análise quantitativa de transcritos reversos do *ScNRT1.5* em colmo de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de colmo foram coletadas nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Para as análises de expressão, o controle utilizado (normalizador) foi a média dos valores de expressão gênica obtidos para o tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH_4NO_3, tempo 0 h). O gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, *n*= 4-5 plantas por tempo amostrado.

As evidências apresentadas aqui sugerem que *ScNRT1.5* é fundamental na regulação da homeostase de nitrato em cana-de-açúcar. Plantas cultivadas sob alta disponibilidade de N apresentam carregamento de xilema via proteína ScNRT1.5 em raízes, o que correlaciona com o fluxo de ^{15}N-nitrato para a parte-aérea, principalmente para folhas jovens de cana-de-açúcar nessas condições (Figura 19A). Por outro lado, em condições limitantes de N, *ScNRT1.5* apresenta regulação distinta em raízes e colmos. Em raízes, *ScNRT1.5* é inibido e/ou pouco regulado em nível transcricional sob condições de baixa disponibilidade de N, o que contrasta com os resultados de maiores concentrações de ^{15}N-nitrato identificados em plantas cultivadas em limitação de N. Em colmo, *ScNRT1.5* é induzido sob deficiência de N, indicando o carregamento de nitrato do xilema, remobilizando o nitrato para estoque nas células desse órgão, com base no importante aumento de 8% de ^{15}N-nitrato detectados em colmo sob condição de limitação de N. Resta saber, se o carregamento de nitrato no xilema estaria levando essa forma inorgânica de N para ser metabolizado em folhas, considerando

que esse é o principal órgão de redução de nitrato em cana-de-açúcar (MARETZKI; DELA CRUZ, 1967, De ARMAS et al., 1992, BIGG, 2003).

Após o transporte para as folhas, o nitrato poderia passar por assimilação no citossol ou ser armazenado em vacúolos. Em arabidopsis, o gene *NRT1.4* apresenta função essencial na regulação da homeostase de nitrato em folhas (CHIU et al., 2004). Apesar do mutante *atnrt1.4* apresentar menor concentração de nitrato no pecíolo, apresenta maior concentração de nitrato no limbo foliar, indicando que *NRT1.4* regula distribuição de nitrato em folhas (CHIU et al., 2004). Curiosamente, as folhas de mutantes *nrt1.4* são mais largas do que os do tipo selvagem, sugerindo que a distribuição de nitrato em folhas influencia na expansão foliar. *AtNRT1.4* é predominantemente expresso em pecíolos, o que demonstra que esse gene regula o estoque de nitrato em células do pecíolo de arabidopsis (CHIU et al., 2004). A análise de expressão do gene ortólogo a proteína transmembrana NRT1.4 em folhas de cana-de-açúcar indicam a regulação desse gene pelo *status* de N da planta. Em folhas maduras, a expressão de *ScNRT1.4* foi induzida principalmente sob condições de alto N após 10 d de tratamento (Figura 25A), enquanto que plantas cultivadas sob condições limitantes de N não apresentaram indução de *ScNRT1.4*. Já em folhas jovens, a regulação de *ScNRT1.4* foi evidente em condições de deficiência de N (Figura 25B). Comparado a plantas em condições de alto N (+), a expressão do gene *ScNRT1.4* foi reprimido em condições de baixo N (-N) em todos os períodos analisados (Figura 25B) Portanto, em condições limitantes de N (-N), o nitrato não é estocado em folhas maduras ou jovens, o que sugere que essa forma inorgânica de N está sendo metabolizada. A regulação de *ScNRT1.4* correlaciona com resultados de ^{15}N-nitrato em folhas (Figuras 18A e 19A), considerando que os maiores valores de concentração de ^{15}N-nitrato foram observados em sob condição de alto N em folhas jovens. Para confirmação desses resultados, a atividade de NR e a medição da concentração de nitrato em diferentes órgãos devem ser realizadas.

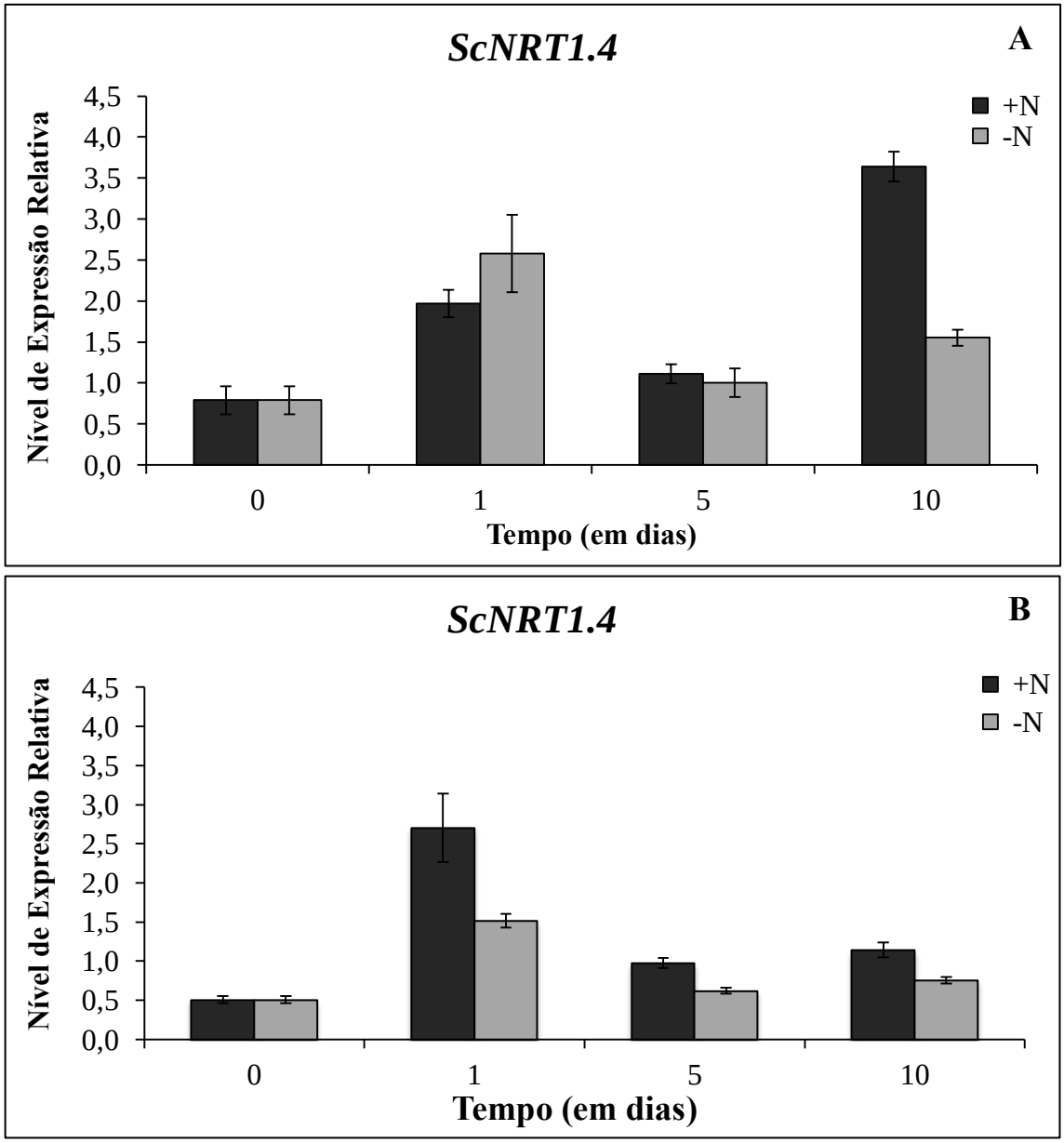


Figura 25 - Análise quantitativa de transcritos reversos do Sc*NRT1.4* em folhas maduras (A) e folhas recém-expandidas (B) de cana-de-açúcar submetidas a condições contrastantes de disponibilidade de N. Plantas de cana-de-açúcar com três meses de cultivo em solução nutritiva suficiente de N (+N; 2 mM de NH_4NO_3) foram submetidas à deficiência de N (-N) e a alto N (5 mM de NH_4NO_3). Amostras de folhas jovens e folhas maduras foram coletadas nos períodos de 0, 1, 5 e 10 d. Para as análises de expressão, o controle utilizado (normalizador) foi a média dos valores de expressão gênica obtidos para o tratamento N suficiente (+N; 2 mM NH_4NO_3, tempo 0 h). O gene *UBQ2* foi utilizado como gene de referência. Barras indicam ±SE, *n*= 4-5 plantas por tempo amostrado.

Em resumo, com a caracterização o processo de transporte de nitrato na parte aérea de cana-de-açúcar realizada por meio de experimentos de translocação/ remobilização utilizando concentrações equimolares de $^{15}N\text{-}NO_3^-$ e $^{15}N\text{-}NH_4^+$ *in vivo*, somada a análise do perfil transcricional dos principais genes responsável pelo transporte de nitrato em cana-de-açúcar,

foi possível identificar diferentes estratégias adaptativas de cana-de-açúcar na regulação do transporte de nitrato mediante as condições contrastante de disponibilidade de N no ambiente. Os resultados apresentados indicaram a capacidade da cana-de-açúcar de utilizar nitrato como fonte de N, apesar da sua reduzida eficiência na aquisição e estoque dessa forma inorgânica de N. Ainda, os resultados apresentados demonstraram que nitrato difere de amônio na distribuição e remobilização de acordo com o status de N da planta. Em condições amplas de suplemento de N, nitrato é similar a amônio quanto à utilização como fonte de N em folhas jovens. No entanto, em condições de deficiência de N, nitrato tem maior fluxo em colmos e raízes, enquanto que amônio ainda permanece com fonte de N em folhas jovens. A regulação distintas do transportador de baixa afinidade *ScNRT1.5* indica que o carregamento de nitrato no xilema é a principal alteração durante o transporte dessa forma inorgânica de N para a parte aérea de cana-de-açúcar.

As espécies vegetais parecem utilizar estratégias distintas para adaptação a condições adversas de disponibilidade de N no solo. Raízes de arabidopsis sob deficiência de N apresentam diminuição da atividade de NR após 4 d de limitação de N (KRAPP et al., 2011). A redução da atividade de NR é acompanhada pela ação da proteína de membrana NRT1.5 realizando o carregamento do nitrato no xilema, aumentando o fluxo dessa forma de N para a parte aérea, onde a atividade de NR em folhas irá reduzir nitrato para assimilação em aminoácidos (KRAPP et al., 2011). Tal mecanismo adaptativo difere do observado em cana-de-açúcar, sendo que a limitação de N reduz o fluxo de nitrato da raiz para a parte-aérea, mantendo baixos níveis de expressão de *ScNRT1.5*. No entanto, o suplemente de nitrato para ser reduzido e assimilado em folhas parece ser de origem do colmo, baseado no aumento de expressão de *ScNRT1.5* nesse órgão. Cana-de-açúcar possui a habilidade de manter maiores concentrações de nitrato em raízes sob deficiência de N (Figura 20), possivelmente pela indução de transportadores responsáveis pela aquisição de N em raízes e concomitante redução do carregamento do xilema (Figura 23), o que difere de arabidopsis (KRAPP et al., 2011). Estudos em campo identificaram que plantas de cana-de-açúcar não fertilizadas alocam 31% do N nas raízes, enquanto que plantas fertilizadas com N apresentam cerca de 28% N na raiz (ROBINSON et al., 2009), o que corrobora os resultados apresentados aqui. Tal estratégia adaptativa em cana-de-açúcar pode ser para realocação de biomassa para a raiz, investindo no crescimento e desenvolvimento de raízes para aumentar a capacidade de explorar regiões mais ricas em nutrientes (REMANS et al., 2006; LIMA et al., 2010). Além disso, a capacidade de estocar N em raízes em condições adversas de disponibilidade desse nutriente pode ser uma fonte de N para cana de soqueira para o próximo ciclo.

5. CONCLUSÃO

- ✓ Cana-de-açúcar possui sistema de absorção HATS para nitrato e amônio presentes nas raízes, que é induzido em baixas concentrações externas de N e/ou em baixo status de N na planta.
- ✓ Foi comprovada a menor eficiência de cana-de-açúcar na aquisição de nitrato quando comparada com a aquisição de amônio.
- ✓ Em plantas de cana-de-açúcar sob condições de deficiência de N (-N) foi verificado regulação tardia do sistema de HATS responsável pela aquisição de nitrato.
- ✓ Constatou-se a existência de regulação negativa na aquisição de nitrato em raízes de cana-de-açúcar expostas à amônio.
- ✓ A ausência de correlação entre o influxo de ^{15}N e acúmulo de transcritos dos transportadores envolvidos no processo de absorção de nitrato indica a existência de uma regulação no nível pós-transcricional dos transportadores de HATS em raízes de cana-de-açúcar durante a provisão de nitrato.
- ✓ Apesar da reduzida eficiência na aquisição e estoque de nitrato, cana-de-açúcar possui a capacidade de utilizar nitrato como fonte de N.
- ✓ Nitrato difere de amônio no processo de remobilização, de acordo com o status de N em cana-de-açúcar. Em condições amplas de suplemento de N, ambos são utilizados como fonte de N. Sob restrição de N, porém, nitrato tem maior fluxo em raízes e colmos enquanto que amônio ainda permanece com fonte de N em folhas jovens.
- ✓ A limitação de N leva a redução no fluxo de nitrato da raiz para a parte-aérea, já que o carregamento desta fonte de N no xilema é alterado em tal condição. O suplemento de nitrato para ser reduzido e assimilado em folhas parece ser de origem do colmo.

REFERÊNCIAS

ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos. **Anuário Estatístico do Setor de Fertilizantes**. São Paulo, 2008.

ASLAM, M.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. Comparative induction of nitrate and nitrite uptake and reduction systems by ambient nitrate and nitrite in intact roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 102, p. 811–819, 1993.

AUSTIN, A.T. et al. Latin America' s nitrogen challenge. **Science**, Washington, DC, v. 340, n. 6129, 2013. DOI: 10.1126/science.1231679.

BAI, H. et al. The nitrate transporter (NRT) gene family in poplar. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 8, e.72126, 2013.

BALDANI, J.I. et al. Review: A brief story of nitrogen fixation in sugarcane — reasons for success in Brazil. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, p. 417-423, 2002.

BELL, M.J. et al. Interactions between rotation breaks, tillage and n management on sugarcane grown at Bundaberg and Ingham. In: CONFERENCE OF THE AUSTRALIAN SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 32., 2010, Bundaberg. **Proceedings…** Mackay, Qld., Australia: Australian Society of Sugar Cane Technologists, 2010. p. 119-139.

BERG, C. **World fuel ethanol analysis and outlook**. Eau Claire, Wisconsin: Murtagh & Associates - Beverage, Fuel and Industrial Alcohol Production Consultants, Online Distillary Network, 2004. Available at http://www.distill.com/World-Fuel-Ethanol-A&O-2004.html Acesso em: 14 ago. 2007.

BEUVE, N. et al. Putative role of gamma-aminobutyric acid (GABA) as a long distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. **Plant Cell and Environment**, Nottingham, v. 27, p. 1035–1046, 2004.

BIGGS, I.M. An investigation of sugarcane nitrogen physiology: sources, uptake and metabolism. 2003. Thesis (PhD) - University of Queensland, St Lucia, Australia, 2003.

BLOOM, A.J.; FINAZZO, J. The influence of ammonium and chloride on potassium and nitrate absorption by barley roots depends on time of exposure and cultivar. **Plant Physiology**, Rockville, v. 81, n. 1, p. 67–69, 1986.

BLOOM, A.J.; SUKRAPANNA, S.S.; WARNER, R.L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1294–1301, 1992.

BOUDSOCQ, S. et al. Plant preference for ammonium versus nitrate: a neglected determinant of ecosystem functioning? **American Naturalist**, Chicago, v. 180, n. 1, p. 60–69, 2012.

BOWMAN, D.C.; PAUL, J.L. Uptake and assimilation of NO3- and NH4+ by nitrogen-deficient perennial ryegrass turf. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, p. 1303–1309, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Brazilian Agroenergy Plan 2006–2011**. Brasília, DF, 2006.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. NH4+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 159, p. 567-584, 2002.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Futile cycling at the plasma membrane: a hall- mark of low-affinity nutrient transport. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 11, p. 529–534, 2006.

BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. Ecological significance and complexity of N-source preference in plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 112, n. 6, p. 957–963, 2013.

BRITTO, D.T. et al. Futile transmembrane NH 4 cycling : A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 98, n. 7, p. 4255–4258, 2001.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, p. 181–199, 1997.

BURNEY, J.A.; DAVIS, S.J.; LOBELL, D.B. Greenhouse gas mitigation by agricultural intensification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 107, n. 26, p. 12052–12057, 2010.

CAI, C. et al. Gene structure and expression of the high-affinity nitrate transport system in rice roots. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, n. 4, p. 443–451, 2008.

CEREZO, M. et al. Major alterations of the regulation of root NO(3)(-) uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 1, p. 262–271, 2001.

CHAILLOU, S. et al. Responses of soybean to ammonium and nitrate supplied in combination to the whole root system or separately in a split- root system. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 90, p. 259–268, 1994.

CHARDON, F. et al. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in Arabidopsis thaliana cultivated with limiting and ample nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 9, p. 2293–302, 2010.

CHIU, C. et al. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1:4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 45, n. 9, p. 1139-1148, 2004.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Levantamento de safra. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2. Acesso em: 2 nov. 2014.

COQUE, M.; GALLAIS, A. Genetic variation for nitrogen remobilization and postsilking nitrogen uptake in maize recombinant inbred lines: heritabilities and correlations among traits. **Crop Science**, Madison, v. 47, p. 1787–1796, 2007.

COQUE, M. et al. Genetic variation of N-remobilization and postsilking N-uptake in a set of maize recombinant inbred lines. III. QTL detection and coincidences. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 117, p. 729–747, 2008.

COX, W.J.; REISERNAUER, H.M. Growth and ion uptake by wheat supplied nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 38, p. 363–380, 1973.

CRAFTS-BRANDNER, S.J.; EGLI, D.B. Sink removal and leaf senescence in soybean. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, p. 662–666, 1987.

CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 3, n. 10, p. 389–395, 1998.

De ANGELI, A. et al. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. **Nature**, London, v. 442, n. 7105, p. 939–942, 2006.

De ARMAS, R. et al. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 140, p. 531–535, 1992.

De RESENDE, A.S. et al. Long-term effects of pre-harvest burning and nitrogen and vinasse applications on yield of sugar cane and soil carbon and nitrogen stocks on a plantation in Pernambuco, N.E. Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 281, n. 1-2, p. 339–351, 2006.

DECHORGNAT, J. et al. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 4, p. 1349–1359, 2001.

DIAZ, C. et al. Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, Rockville, v. 147, p. 1437–1449, 2008.

DIRZO, R.; RAVEN, P.H. Global state of biodiversity and loss. **Annual Review of Environment and Resources**, Palo Alto, v. 28, p. 137–167, 2003.

DODDEMA, H.; TELKAMP, G.P. Uptake of nitrate by mutants of Arabidopsis thaliana, disturbed in uptake or reduction of nitrate. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 45, p. 332–338, 1979.

EGLI, D.B. Time and the productivity of agronomic crops and cropping systems. **Agronomy Journal**, Madison, v. 103, p. 743–750, 2011.

EGLI, D.B.; LEGGETT, J.E.; DUNCAN, W.G. Influence of N stress on leaf senescence and N redistribution in soybeans. **Agronomy Journal**, Madison, v. 70, p. 43–47, 1976.

FAN, X. et al. Comparing nitrate storage and remobilization in two rice cultivars that differ in their nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 1729–1740, 2007.

FELLER, U.; ANDERS, I.; MAE, T. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 7, p. 1615–1624, 2008.

FENG, J.; VOLK, R.J.; JACKSON, W.A. Inward and outward transport of ammonium in roots of maize and sorghum: contrasting effects of methionine sulphoximine. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 45, p. 429–439, 1994.

FENG, H. et al. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 7, p. 2319–2332, 2011.

FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, Ë. Expression analysis of a high-afinity nitrate transporter isolated from Arabidopsis thaliana by differential display. **Planta**, Berlin, v. 207, n. 3, p. 1999.

FILLEUR, S. et al. An arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 489, n. 2-3, p. 220–224, 2001.

FLAVELL, R. et al. **Moving forward with biofuels**. Oak Ridge, Tennessee: Biotechnology and Biological Sciences Research Council, 2011. 5 p. Disponível em: http://dbkgroup.org/Papers/flavell_nature_outlook11.pdf.

FOLEY, J.A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, London, v. 478, n. 7369, p. 337–342, 2011.

FOLEY, J.A. et al. Closing yield gaps through nutrient and water management. **Nature**, London, v. 490, n. 7419, p. 254–257, 2012.

FORDE, B.G.; CLARKSON, D.T. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. **Advances in Botanical Research**, London, v. 30, p. 1–90, 1999.

FORDE, B.G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1465, n. 1-2, p. 219–235, 2000.

FRAISIER, V. et al. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in Nicotiana plumbaginifolia : evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 489-496, 2000.

FRANCO, H.C.J. et al. Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 121, n. 1, p. 29–41, 2011.

FRIED, M.F. et al. Characterizing the NO3- and NH4+ uptake process of rice roots by use of 15N-labeled NH4NO3. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 18, p. 313–320, 1965.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 295–306, 2004.

GALLAIS, A. et al. Modelling postsilking nitrogen fluxes in maize (*Zea mays*) using 15 N-labelling field experiments. **New Phytologist**, London, v. 172, p. 696–707, 2006.

GALLOWAY, J.N.; COWLING, E.B. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. **Ambio**, Stockholm, v. 31, p. 64–71, 2002.

GALLOWAY, J.N. et al. Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. **Science**, Washington, DC, v. 320, n. 5878, p. 889–892, 2008.

GAN, S.; AMASINO, R.M. Making sense of senescence molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, p. 313–319, 1997.

GARNETT, T. et al. The response of the maize nitrate transport system to nitrogen demand and supply across the lifecycle. **New Phytologist**, London, v. 198, n. 1, p. 82–94, 2013.

GARNETT, T.; CONN, V.; KAISER, B.N. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 32, n. 9, p. 1272–1283, 2009.

GASTAL, F.; LEMAIRE, G. N uptake and distribution in crops : an agronomical and ecophysiological perspective. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 789–799, 2002.

GAVA, G.J.C. et al. Crescimento e acúmulo de nitrogênio em cana-de-açúcar cultivada em solo coberto com palha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 11, p. 1347-1354, 2001.

GAZZARRINI, S. et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 3, pp.937–947, 1999.

GIVAN, C.V. Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. **Phytochemistry**, London, v. 18, p. 375–382, 1979.

GLASS, A.D.M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, London, v. 22, n. 5, p. 453–470, 2003.

GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. Nitrogen absorption by plant roots. In: SRIVASTAVA, H.S.; SINGH, R.P. (Ed.). **Nitrogen nutrition in higher plants**. New Delhi, India: Associated Publishers, 1995. p. 21–56.

GLASS, A.D.M.; THOMPSON, R.G.; BORDELEAU, L. Regulation of NO3- influx in barley. Studies using 13NO3-. **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, p. 379–381, 1985.

GLASS, A.D.M. et al. Ammonium fluxes into plant roots : energetics, kinetics and regulation. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Hoboken, v. 160, p. 261-268, 1997.

GLASS, A.D.M. et al. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Hoboken, v. 164, p. 199–207, 2001.

GLASS, A.D.M. et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 855–864, 2002.

GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J.C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 328–338, 2009.

GOLDEMBERG, J. Ethanol for a sustainable energy future. **Science**, Washington, DC, v. 315, p. 5813, p. 808–810, 2007.

GOOD, A.G.; SHRAWAT, A.K.; MUENCH, D.G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, n. 12, p. 597–605, 2004.

HAGEMAN, R.H. Ammonium versus nitrate nutrition of higher plants. In: HAUCK, R.D. (Ed.). **Nitrogen in crop production**. Madison, WI: ASA; CSSA; SSSA, 1984. p. 67–85.

HARTT, C.E. Effect of nitrogen deficiency upon translocation of 14C in sugarcane. **Plant Physiology**, Rockville, v. 46, p. 419–422, 1970.

HATZFELD, Y.; SAITO, K. Identification of two putative nitrate transporters highly homologous to CHL1 from Arabidopsis thaliana (Accession Nos. AJ011604 and AJ131464) (PGR 99–018). **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, p. 805, 1999.

HEGELUND, J.N. et al. Zinc fluxes into developing barley grains: use of stable Zn isotopes to separate root uptake from remobilization in plants with contrasting Zn status. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 361, p. 241–250, 2012. doi: 10.1007/s11104-012-1272-x.

HENRIKSENZ, G.H.; SPANSWICK, R.M. Investigation of the apparent lnduction of nitrate uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) using N03--selective microelectrodes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, p. 885–892, 1993.

HIREL, B. et al. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2369–2387, 2007.

HO, C.-H. et al. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, Cambridge, v. 138, n. 6, p. 1184–1194, 2009.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, CA: University of California, Agriculture Experimental Station, 1950. (Circular, 347).

HOLE, D.J. et al. Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 642–647, 1990.

HORTENSTEINER, S.; FELLER, U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 927–937, 2002.

HSU, P.-K.; TSAY, Y.-F. Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth. **Plant Physiology**, Rockville, v. 163, n. 2, p.844–856, 2013.

HTWE, N.M.P.S. et al. Leaf senescence of soybean at reproductive stage is associated with induction of autophagy-related genes, GmATG8c, GmATG8i and GmATG4. **Plant Production Science**, Kyoto, v. 14, p. 141–147, 2011. doi: 10.1626/pps.14.141.

HUANG, N. et al. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, p. 1381–1392, 1999.

ISHIDA, H. et al. Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. **Plant Physiology**, Rockville, v. 148, p. 142–155, 2008.

KATO, Y.; SAKAMOTO, W. New insights into the types and function of proteases in plastids. **International Review of Cell and Molecular Biology**, Amsterdam, v. 280, p. 185-218, 2010.

KIBA, T. et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 24, n. 1, p. 245–258, 2012.

KONISHI, M.; YANAGISAWA, S., 2013. Arabidopsis NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling. **Nature Communications**, London, v. 4, p. 1617. doi: 10.1038/ncomms2621.

KOTUR, Z.; GLASS, A.D. A 150 kDa Plasma membrane complex of AtNRT2.5 and AtNAR2.1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in *Arabidopsis thaliana*. **Plant, Cell & Environment**, New York, 2014. doi: 10.1111/pce.12496.

KRAPP, A. et al. Expression studies of Nrt2:1Np, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. **Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 723–731, 1998.

KRAPP, A. et al. Arabidopsis roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 157, n. 3, p. 1255–1282, 2011.

KRAPP, A.; SALIBA-COLOMBANI, V.; DANIEL-VEDELE, F. Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 83, n. 2, p. 251–263, 2005.

KRONZUCKER, H.: GLASS, A.M.: YAEESH SIDDIQI, M. Nitrate induction in spruce: an approach using compartmental analysis. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 4, p. 683–690, 1995.

KRONZUCKER, H.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.M. Compartmentation and flux characteristics of nitrate in spruce. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 4, p. 674–682, 1995.

KRONZUCKER, H.J. et al. Effects of hypoxia on 13NH4 + fluxes in rice roots 1 kinetics and compartmental analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 581–587, 1998.

KRONZUCKER, H.J. et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 6, n. 8, p. 335–337, 2001.

KRONZUCKER, H.J. Comparative kinetic analysis of ammonium and nitrate acquisition by tropical lowland rice : implications for rice cultivation and yield potential. **New Phytologist**, London, v. 145, p. 471–476, 2000.

KRONZUCKER, H.J.; GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. Inhibition of nitrate uptake by ammonium in barley. analysis of component fluxes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 283–291, 1999.

KROUK, G. et al. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. **Developmental Cell**, Cambridge, v. 18, n. 6, p. 927–937, 2010.

KROUK, G.; TILLARD, P.; GOJON, A. Regulation of the high-affinity NO3- uptake system by NRT1.1-mediated NO3- demand signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, n. 3, p. 1075–1086, 2006.

LAINÉ, P.; OURRY, A.; BOUCAUD, J. Shoot control of nitrate uptake rates by roots of *Brassica napus* L.: Effects of localized nitrate supply. **Planta**, Berlin, v. 196, n. 1, p. 77-83, 1995.

LAM H.M. et al. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into aminoacids in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 47, p. 569–593, 1996.

LANQUAR, V. et al. Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 21, n. 11, p. 3610–3622, 2009.

LAUGIER, E. et al. Regulation of high-affinity nitrate uptake in roots of Arabidopsis depends predominantly on posttranscriptional control of the NRT2.1/NAR2.1 transport system. **Plant Physiology**, Rockville, v. 158, n. 2, p. 1067–1078, 2012.

LEA, P.; AZEVEDO, R. Nitrogen use efficiency. 1. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 149, p. 243-247, 2006.

LEA, P.; MIFLIN, B. (2011) Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. In: FOYER, C.; ZHANG, H. (ed.). **Nitrogen metabolism in plants in the post-genomic era.** West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2011. p. 1-40.

LEAL, G.A.; ALBUQUERQUE, P.S.B.; FIGUEIRA, A. Genes differentially expressed in Theobroma cacao associated with resistance to witches' broom disease caused by *Crinipellis perniciosa*. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 279–292, 2007.

LEE, R.B.; DREW, M.C. Rapid, reversible inhibition of nitrate influx in barley by ammonium. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 40, p. 741–752, 1989.

LEE, R.B.; RUDGE, K.A. Effects of N deficiency on theabsorption of nitrate and ammonium by barley plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 57, p. 471–486, 1986.

LEE, T.S.G. Micropropagation of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 10, p. 47-55, 1987.

LEE, R.B.; PURVES, J.V.; RATCLIFFE, R.G.; SAKER, L.R. Nitrogen assimilation and the control of ammonium and nitrate absorption by maize roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 43, p. 1385-1396, 1992.

LEJAY, L. et al. Molecular and functional regulation of two NO3- uptake systems by N- and C-status of Arabidopsis plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 509–519, 1999.

LEMAÎTRE, T. et al. Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in Arabidopsis thaliana Wassileskija accession. **Plant & Cell Physiology**, Tokyo, v. 49, n. 7, p. 1056–1065, 2008.

LEZHNEVA, L. et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants. **Plant Journal**, Oxford, v. 80, n. 2, p. 230–241, 2014.

LI, B. et al. Physiological and molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 287, n. 1-2, p. 145–159, 2006.

LI, J.-Y. et al. The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 5, p. 1633–1646, 2010.

LI, W. et al. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 1, p. 425–433, 2007.

LILLO, C. Signalling cascades integrating light-enhanced ni- trate metabolism. **Biochemical Journal**, Colchester, v .415, p. 11–19, 2008.

LIMA, J.E. et al. Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 11, p. 3621–3633, 2010.

LIN, S.-H. et al. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. **Plant Cell**, Rockville, v. 20, n. 9, p. 2514–2528, 2008.

LIU, K.-H.; TSAY, Y.-F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **The EMBO Journal**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 1005–1013, 2003.

LOQUÉ, D.; von WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, p. 1293–1305, 2004.

LOQUÉ, D. et al. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 522–534, 2006.

MALAGOLI, P. et al. Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 388–400, 2004.

MALAGOLI, P. et al. Dynamics of nitrogen uptake and mobilization in field-grown winter oilseed rape (*Brassica napus*) from stem extension to harvest: I. Global N flows between vegetative and reproductive tissues in relation to leaf fall and their residual N. **Annals of Botany**, Oxford, v. 95, n. 5, p. 853–861, 2005.

MARCHIVE, C. et al. Nuclear retention of the transcription factor NLP7 orchestrates the early response to nitrate in plants. **Nature Communications**, London, v. 4, p.1713. 2013.

MARETZKI, A.; DELA CRUZ, A. Nitrate redutase in sugarcane tissues. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 8, p. 605–611, 1967.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2. ed. New York: Academic Press, 1995.

MARSCHNER, H.; MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3. ed. New York: Academic Press, 2012.

MARTIN, A. et al. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. **Plant Cell,** Rockville, v. 18, p. 3252–3274, 2006.

MARTIN, A. et al. Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness : agronomic, physiological and molecular aspects. **New Phytologist**, London, v. 167, p. 483-492, 2005.

MARTINELLI, L.A.; FILOSO, S. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 18, n. 4, p. 885–898, 2008.

MASCLAUX, C. et al. The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physio-agronomic and molecular approaches. **Annals of Applied Biology**, Cambridge, v. 138, p. 68–81, 2001.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; CHARDON, F. Exploring nitrogen remobilization for seed filling using natural variation in Arabidopsis thaliana. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 2131–2142, 2011.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C. et al. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, Oxford, v. 105, n. 7, p. 1141–1157, 2010.

MEIER, E.A.; THORBURN, P.J.; PROBERT, M.E. Occurrence and simulation of nitrification in two contrasting sugarcane soils from the Australian wet tropics. **Soil Research**, Clayton, v. 44, n. 1, p. 1-9, 2006.

MENDES, L.C. **Eficiência nutricional de cultivares de cana-de-açúcar**. 2006. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MILLER, A.J. et al. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 9, p. 2297–2306, 2007.

MILLER, S.A. Minimizing land use and nitrogen intensity of bioenergy. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 44, n. 10, p. 3932–3939, 2010.

MUCHOW, R.C.; ROBERTSON, M.J. Relating crop nitrogen uptake to sugarcane yield. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 16, p. 122–130, 1994.

MUCHOW, R.C. et al. Effect of nitrogen on the time-course of sucrose accumulation in sugarcane. Field Crops Research, Amsterdam, v. 47, n. 2-3, p. 143–153, 1996.

MUNÕS, S. et al. Transcript Profiling in the chl1-5 Mutant of Arabidopsis Reveals a Role of the Nitrate Transporter NRT1.1 in the Regulation of Another Nitrate Transporter, NRT2.1. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 3, p. 2433–2447, 2004.

NAZOA, P. et al. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in Arabidopsis thaliana: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 52, n. 3, p. 689–703, 2003.

NIEVES-CORDONES, M.; MILLER, A.J. A putative role for the plasma membrane potential in the control of the expression of the gene encoding the tomato high-affinity potassium transporter HAK5. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 68, n.6, p. 521–532, 2008.

NOQUET, C. et al. Effects of altered source-sink relationships on N allocation and vegetative storage protein accumulation in *Brassica napus* L. **Plant Science**, Amsterdam, v. 166, p. 1007–1018, 2004.

OKAMOTO, M. et al. High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-Like gene AtNRT3.1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 140, p. 1036–1046, 2006.

OKAMOTO, M.; VIDMAR, J.J.; GLASS, A.D.M. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of Arabidopsis thaliana: responses to nitrate provision. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 44, n. 3, p. 304–317, 2003.

OLIVEIRA, I.C. et al. Overexpression of cytosolic glutamate synthetase. Relation to nitrogen, light, and photorespiration. **Plant Physiology**, Rockville, v. 129, p.1170–1180, 2002.

OLIVEIRA, F.A. et al. Adubação de soqueira de cana-de-açúcar com soluções de carbonato/bicarbonato de amônio em mistura com sais de potássio e de fósforo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 1027–1033, 1999.

OLIVEIRA, M.W. et al. Nutrição mineral e adubação da cana-de-açúcar. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 28, p. 30-43, 2007.

ONO, F.; FROMMER, W.B.; WIRÉN, N. Coordinated diurnal regulation of low- and high-affinity nitrate transporters in tomato. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, n. 1, p. 17–23, 2000.

ORSEL, M. et al. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. **Plant Physiology**, Rockville, v. 142, n. 3, p. 1304–1317, 2006.

PATTERSON, T.G.; BRUN, W.A. Influence of sink removal in the senescence pattern of wheat. **Crop Science**, Madison, v. 20, p. 19–23, 1980.

PEOPLES, M.B. et al. Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: BACON, P.E. (Ed.). **Nitrogen fertilizer in the environment**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 565–606.

PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, B.N.; BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT Gene families of dicots and grass species. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, e. 15289, 2010.

QUAGGIOTTI, S. et al. Expression of a putative high-affinity NO3- transporter and of an H+-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, p. 1023–1031, 2003.

RAHAYU, Y.S. et al. Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO3--induced stimulation of leaf growth. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 1143–1152, 2005.

RANJITH, S. Effect of external nitrogen and potassium supply on xylem sap composition of sugarcane. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 30, p. 187–201, 2007.

RAVEN, J.A.; WOLLENWEBER, B.; HANDLEY, L.L. A comparison of ammonium and nitrate as nitrogen sources for photolithotrophs. **New Phytologist**, London, v. 121, n. 1, p. 19–32, 1992.

REMANS, T. et al. The Arabidopsis NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 103, n. 50, p. 19206–19211, 2006.

ROBINSON, N.; VOGT, J. Nitrogen Physiology of Sugarcane. In: MOORE, P.H.; BOTHA, F.C. (Ed.). Sugarcane: Physiology, biochemistry & functional biology. Hoboken: Wiley, 2014. p. 169–195.

ROBINSON, N. et al. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 4, e. 19045, 2011.

ROBINSON, N. et al. Evidence of differences in nitrogen use efficiency in sugarcane genotypes. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 31, p. 256–264, 2009.

ROCKSTRÖM, J. et al. A safe operating space for humanity. **Nature**, London, v. 461, p. 472–475, 2009.

ROSSITER-RACHOR, N.A. et al. Invasive *Andropogon gayanus* (gamba grass) is an ecosystem transformer of nitrogen relations in Australian savanna. **Ecological Applications**, Washington, DC, v. 19, n. 6, p. 1546–1560, 2009.

RUFFEL, S. et al. Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 146, n. 4, p. 2020–2035, 2008.

SALSAC, L. et al. Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 25, p. 805–812, 1987.

SCHEIBLE, W.R. et al. Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. **Plant Journal**, Oxford, v. 11, p. 671-691, 1997a.

SCHEIBLE, W.R. et al. Tobacco mutants with a decreased number of functional nia-genes compensate by modifying the diurnal regulation transcription, post-translational modification and turnover of nitrate reductase. **Planta**, Berlin, v. 203, p. 305–319, 1997b.

SCHLESINGER W.H. On the fate of anthropogenic nitrogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, p.203–208, 2009.

SCHRÖDER, J.J. et al. The effects of nutrient losses from agriculture on ground and surface water quality: the position of science in developing indicators for regulation. **Environmental Science & Policy**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 15–23, 2004.

SCHULZE, W. et al. Growth and reproduction of Arabidopsis in relation to storage of starch and nitrate in the wild-type and in starch-deficient and nitrate- uptake-deficient mutants. **Plant Cell and Environment**, Nottingham, v. 17, p. 795–809, 1994.

SEGONZAC, C. et al. Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an Arabidopsis excretion transporter. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 11, p. 3760–3777, 2007.

SERENO, M.L. et al. Response of sugarcane to increasing concentrations of copper and cadmium and expression of metallothionein genes. **Journal of Plant Physiology**, Amsterdam, v. 164, n. 11, p. 1499–1515, 2007.

SIDDIQI, M.Y.; KING, B.J.; GLASS, A.D.M. Effects of nitrite, chlorate, and chlorite on nitrate uptake and nitrate reductase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 100, p. 644–650, 1992.

SIDDIQI, M.Y. et al. Studies of the regulation of nitrate influx by barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 3, p. 806–813, 1989.

SIDDIQI, M.Y. et al. Studies of the uptake of nitrate in barley (I. Kinetics of $^{13}NO_3^-$ influx). **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, p. 1426–1432, 1990.

SILVEIRA, J.A.G.; CRÓCOMO, O.J. Assimilação de nitrogênio em cana-de açúcar cultivada em presença de elevado nível de n e de vinhaça no solo. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 2, n. 2, p. 7–15, 1990.

SIMMONS, B.A.; LOQUE, D.; BLANCH, H.W. Next-generation biomass feedstocks for biofuel production. **Genome Biology**, London, v. 9, n. 12, p. 242, 2008. doi: 10.1186/gb-2008-9-12-242.

SIMONETE, M.A.; KIEHL, J.D.C.; ANDRADE, C.A. Efeito do lodo de esgoto em um Argissolo e no crescimento e nutrição de milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 38, n. 10, p. 1187–1195, 2003.

SONODA, Y. et al. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 44, p. 1396–1402, 2003.

SPEROTTO, R.A. et al. Effects of different Fe supplies on mineral partitioning and remobilization during the reproductive development of rice (*Oryza sativa* L.). **Rice**, New York, v. 5, n. 1, p. 27, 2012. doi: 10.1186/1939-8433-5-27.

STITT, M. et al. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 959–970, 2002.

SUBBARAO, G.V. et al. Evidence for biological nitrification inhibition in Brachiaria pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 106, n. 41, p. 17302–17307, 2009.

SZCZERBA, M.W.; BRITTO, D.T.; SHABANA, A.A.; BALKOS, K.D.; KRONZUCKER, H.J. NH4+-stimulated and -inhibited components of K+ transport in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, p. 3415–3423, 2008.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 2319–2327, 2007.

TAKEI, K. et al. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf : implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 42, n. 1, p. 85–93, 2001.

TAKEI, K. et al. AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in Arabidopsis. **Plant & Cell Physiology**, Kyoto, v. 45, n. 8, p. 1053–1062, 2004.

TAMURA, W. et al. Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. **Amino Acids**, Heidelberg, v. 39, p. 1003–1012, 2010.

TANG, Z. et al. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. **Plant Physiology**, Rockville, v. 160, n. 4, p. 2052–2063, 2012.

THOMAS, H.; STODDART, J.L. Leaf senescence. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 31, p. 83–111, 1980.

TILLARD, P. et al. Are phloem amino acids involved in the shoot to root control of NO − uptake in Ricinus communis plants ? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, n. 325, p. 1371–1379, 1998.

TILMAN, D., 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion : The need for sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 96, p. 5995–6000, 1999.

TILMAN, D. et al. Forecasting agriculturally driven global environmental change. **Science**, Washington, DC, v. 292, n. 5515, p. 281–284, 2001.

TILMAN, D. et al. Beneficial biofuels—the food, energy, and environment trilemma. **Science**, Washington, DC, v. 325, n. 5938, p. 270-271, 2009.

TISCHNER, R. et al. Effect of nitrate pulses on the nitrate-uptake rate , synthesis of mRNA coding for nitrate reductase, and nitrate-reductase activity in the roots of barley seedlings. **Planta**, Berlin, v. 189, n. 4, p.533–537, 1993.

TOMPKINS, G.A.; JACKSON, W.A.; VOLK, R.J. Accelerated nitrate uptake in wheat seedlings: effects of ammonium and nitrite treatments and of six methyl purine and puromycin. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 43, p. 166–171, 1978.

TONG, Y. et al. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. **Plant Journal**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 442–450, 2005.

TRIVELIN, P.C.O.; OLIVEIRA, M.W. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 37, n. 2, p. 193–201, 2002.

TSAY, Y.F. et al. The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. **Cell**, Cambridge, v. 72, n. 5, p. 705–713, 1993.

TSAY, Y.-F. et al. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 581, n. 12, p. 2290–300, 2007.

TUCKER, D.E.; ALLEN, D.J.; ORT, D.R. Control of nitrate reductase by circadian and diurnal rhythms in tomato. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 2, p. 277–285, 2004.

UAUY, C. et al. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. **Science**, Washington, DC, v. 314, p. 1298–1301, 2006.

ULLRICH, W.R. et al. Ammonium uptake in Lemna gibba G1, related membrane potential changes, and inhibition of anion uptake. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 61, p. 369–376, 1984.

UNICA. **Statistics of sugarcane sector** - 2007. São Paulo, 2007. Disponível em: http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/.

UNICA. **Statistics of sugarcane sector** - 2009. São Paulo, 2007. Disponível em: http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/.

Van HEERDEN, P.D.R. et al. Biomass accumulation in sugarcane: unravelling the factors underpinning reduced growth phenomena. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 61, n. 11, p. 2877–2887, 2010.

VIDMAR, J.J. et al. Regulation of HvNRT2 expression and high- affinity nitrate influx in roots of Hordeum vulgare by ammonium and amino acids. **Plant Physiology**, Rockville, v. 123, p. 307-318, 2000.

VITOUSEK, P.M.et al. Agriculture nutrient imbalances in agricultural development. **Science**, Washington, DC, v. 324, p. 1519-1520, 2009.

Von der FECHT-BARTENBACH, J. et al. CLC-b-mediated NO-3/H+ exchange across the tonoplast of Arabidopsis vacuoles. **Plant Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, n. 6, p. 960–968, 2010.

Von WIREN, N. et al. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. **Plant Journal**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 167–175, 2000.

Von WITTGENSTEIN, N.J.J.B. et al. Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 14, n. 3, p. 11, 2014. doi: 10.1186/1471-2148-14-11.

WACLAWOVSKY, A.J. et al. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 263–76, 2010.

WADA, S.; ISHIDA, H. Chloroplasts autophagy during senescence of individually darkened leaves. **Plant Signaling & Behavior**, Philadelphia, v. 4, n. 6, p. 565–567, 2009.

WANG, M.Y.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Interactions between K+ and NH4+ effects on ion uptake by rice roots. **Plant Cell and Environment**, Nottingham, v. 19, p. 1037-1046, 1996.

WANG, M.Y. et al. Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of 13NH4+ Influx across the Plasmalemma). **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1259–1267, 1993a.

WANG, M.Y. et al. Ammonium uptake by rice roots (III. Electrophysiology). **Plant Physiology**, Rockville, v., 104, n. 3, p. 899–906, 1993b.

WANG, R. et al. A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 151, n. 1, p. 472–478, 2009.

WANG, Y.-Y.; TSAY, Y.-F. Arabidopsis nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport. **Plant Cell**, Rockville, v. 23, n. 5, p. 1945–1957, 2011.

WATERS, B.M. et al. Wheat (*Triticum aestivum*) NAM proteins regulate the translocation of iron, zinc, and nitrogen compounds from vegetative tissues to grain. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 15, p. 4263–4274, 2009.

WIRTH, J. et al. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2. 1 Protein level in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 282, n. 32, p. 23541–23552, 2007.

WOLT, J.D. **Soil solution chemistry**: applications to environmental science and agriculture. New York: John Wiley and Sons, 1994.

WOOD, A.W.; SCHROEDER, B.L.; DWYER, R. Opportunities for improving the efficency of use of nitrogen fertiliser in the Australian sugar industry. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Mackay, v. 32, p. 221–233, 2010.

WU, C.-Y. et al. Uptake, translocation, and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 6767–6773, 2010.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 63, p. 153–182, 2012.

YAN, M. et al. Rice OsNAR2.1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. **Plant, Cell & Environment**, New York, v. 34, n. 8, p. 1360–1372, 2011.

YONG, Z.; KOTUR, Z.; GLASS, A.D.M. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from Arabidopsis roots. **Plant Journal**, Oxford, v. 63, n. 5, p. 739–748, 2010.

YUAN, L. et al. The organization of high-affinity ammonium uptake in Arabidopsis roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. **Plant Cell**, Rockville, v. 19, n. 8, p. 2636–2652, 2007.

YUAN, L. et al. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, Rockville, v. 143, n. 2, p. 732–744, 2007.

ZHANG, H.; FORDE, B.G. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 342, p. 51–59, 2000.

ZHUO, D. et al. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of Arabidopsis thaliana. **Plant Journal** , Oxford, v. 17, n. 5, p. 563–568, 1999.

ANEXO

Anexo A – Concentrações de sais de Hoagland empregadas no preparo da solução nutritiva utilizada nos experimentos realizados em casa de vegetação

Solução estoque	Sais	Concentração (g/L)	Volume de cada solução estoque em 300L (em mL)
Solução 1	KH_2PO_4	13,6	3000
	$MgSO_4.7H_2O$	24,64	
	K_2SO_4	4,36	
Solução 2	$CaCl_2.2H_2O$	14,7	750
Solução 3	NH_4NO_3	80,04	600
Solução 4	NaOH	3,65	300
	EDTA	33,2	
	$FeSO_4.7H_2O$	25	
Solução 5	KCl	3,73	300
	H_3BO_3	1,85	
	$MnSO_4.H_2O$	0,845	
	$CuSO_4$	0,16	
	$ZnSO_4.7H_2O$	0,285	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,242	
Solução 6	KOH	112,218	18