

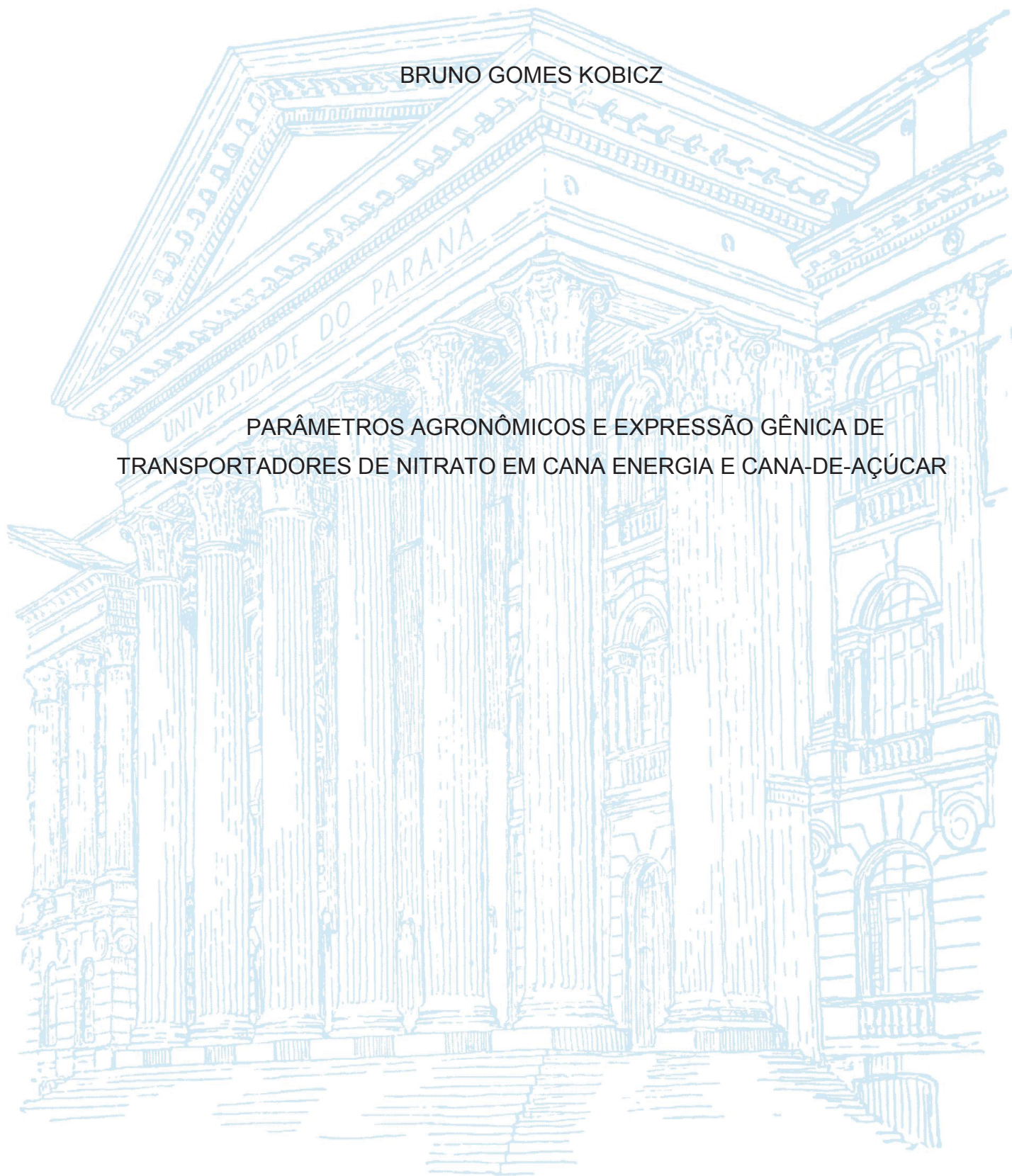
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO GOMES KOBICZ

PARÂMETROS AGRONÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE
TRANSPORTADORES DE NITRATO EM CANA ENERGIA E CANA-DE-AÇÚCAR

CURITIBA

2020



BRUNO GOMES KOBICZ

PARÂMETROS AGRONÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE
TRANSPORTADORES DE NITRATO EM CANA ENERGIA E CANA-DE-AÇÚCAR

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Bernaldo Filho

CURITIBA

2020

Kobicz, Bruno Gomes
Parâmetros agronômicos e expressão gênica de transportadores de nitrato em cana energia e cana-de-açúcar. / Bruno Gomes Kobicz. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia.

Orientador: João Carlos Bepalhok Filho.

1. Cana-de-açúcar. 2. Ácido ribonucleico - Análise. 3. Biomassa vegetal. 4. Nitrogênio. I. Bepalhok Filho, João Carlos. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO AGRONOMIA
(PRODUÇÃO VEGETAL) - 40001016031P6

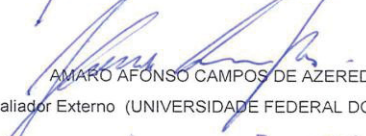
TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **BRUNO GOMES KOBICZ** intitulada: **PARÂMETROS AGRONÔMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITRATO EM CANA ENERGIA E CANA-DE-AÇÚCAR**, sob orientação do Prof. Dr. JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 16 de Março de 2020.


JOÃO CARLOS BESPALHOK FILHO
Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


AMARO AFONSO CAMPOS DE AZEREDO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


JOSÉ LUIS CAMARGO ZAMBON
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico minha dissertação a todos que estiveram ao meu lado durante esse período de novos horizontes.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, professor Dr. João Carlos Bepalhok Filho, por ter aceitado a realização desse projeto e ter feito parte dessa etapa acadêmica que passei.

Em igual lugar, agradeço ao Msc. Tales Romano, por ter sido fundamental desde o início do projeto. Sem todo o empenho, disponibilidade e paciência, nada teria sido possível.

Em sequência, gostaria de agradecer minha família por sempre estar ao meu lado para mostrar que posso sempre ir cada vez mais longe. Em especial, ao meu pai Antonio, que desde sempre me aconselha e apoia incondicionalmente.

A todos meus queridos amigos que fizeram esse período de dois anos ser mais descontraído.

Agradeço também ao programa de Pós-graduação em Agronomia - UFPR. Foi graças a esse incrível programa de Pós-graduação que pude desenvolver ainda mais meu conhecimento, e também me mostrou uma área de atuação que eu sequer pude me imaginar envolvido antes.

Por fim, agradecer a instituição de fomento, CAPES, por proporcionar mesmo em tempos difíceis à ciência e pesquisa, a minha manutenção na realização desse projeto.

Meus sinceros agradecimentos a todos que estiveram presentes nesse período de novos ares.

Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas. Pessoas transformam
o mundo.

(PAULO FREIRE, 1979).

RESUMO

A cana-de-açúcar tem grande impacto na economia brasileira e faz com que o Brasil tenha a posição número um na produção mundial de cana-de-açúcar e derivados. Essa cultura agrícola é uma das apostas na procura por combustíveis renováveis que minimizem impactos ambientais e a utilização do petróleo como fonte energética. Nesse contexto a cana energia, um híbrido de cana-de-açúcar, é uma promessa que possui eficiente produção de biomassa e enfoque na produção de energia, eletricidade e etanol de segunda geração. Adicionado a isso, há evidências sobre a cana energia possuir capacidade de ser plantada em locais com solos de baixa fertilidade. Para que ocorra bom desenvolvimento da cultura e consequentemente adequada produtividade, o manejo agrícola utiliza o nitrogênio como parte da adubação. O nitrogênio desempenha papel metabólico, fisiológico e estrutural nas plantas, sendo componente essencial ao desenvolvimento vegetal. A forma mais comum desse nutriente é a forma mineral de nitrato. A absorção desse nitrato ocorre por meio de proteínas transportadoras transmembranas derivadas de diversas famílias gênicas. Deste modo o objetivo geral do trabalho foi avaliar a resposta ao nitrato de amônio em parâmetros agronômicos e na expressão gênica de transportadores de nitrato em genótipos de cana-de-açúcar e cana energia. No primeiro capítulo foi feita a avaliação da resposta de 16 genótipos de cana energia e dois de cana-de-açúcar, na presença de duas concentrações de nitrogênio, baixa (0,5 mM) e alta (5 mM), para então ser feita uma seleção de genótipos de cana energia com resultados contrastantes. Por meio de parâmetros agronômicos de altura, massa seca de raízes, massa seca da parte aérea e diâmetro de colmo, foram selecionados os genótipos: PRBIO-137, genótipo de melhor resposta ao nitrogênio em concentração baixa, PRBIO-172 como contrastante e RB867515 por ser um genótipo de cana-de-açúcar convencional, ter grande importância comercial no Brasil e ter apresentado resultados similares a PRBIO-172. No segundo capítulo foi avaliada a expressão gênica dos transportadores de nitrato NRT1.1 e NRT2.1 nas duas concentrações de nitrogênio previamente avaliadas. Para esse experimento, foi observado que houve maior expressão gênica, e consequentemente, maior absorção de nitrogênio, para os dois genes e nos três genótipos avaliados na concentração mais alta de nitrato de amônio.

Palavras-chave: RT-PCR; *Saccharum spp*; nitrogênio, crescimento vegetal.

ABSTRACT

Sugarcane has a great impact on the Brazilian economy and makes Brazil be the number one in the world production of sugarcane and its derivatives. This crop is one of the main sources of sustainable fuels to minimize environmental impacts and the use of oil as an energy source. In this context, energy cane, a hybrid of sugarcane, is a new promise that has an efficient production of biomass and focus on the production of energy, electricity and second-generation ethanol. There is an evidence that energy cane has the capacity to be cultivated in low fertility soils. For the adequate crop development and consequently high productivity, the management uses nitrogen as part of fertilization. Nitrogen plays a metabolic, physiological and structural role in plants, being an essential component for plant development. The most usual form of this nutrient is the mineral form of nitrate. The uptake of this nitrate occurs by transport proteins that are composed of several gene families. Thus, the general aim of the work was to evaluate the response to ammonium nitrate by agronomic parameters and gene expression of nitrate transporters in sugarcane and energy cane genotypes. The first chapter, evaluated the response of 16 genotypes of energy cane and two of sugarcane in the presence of two concentrations of nitrogen, low (0.5 mM) and high (5 mM), to be done a selection of contrasting energy cane genotypes. By agronomic parameters of height, leaves dry matter, root dry matter and culm diameter, the genotypes select were: PRBIO-137, genotype with the best response to low-dose nitrogen, PRBIO-172 as the contrasting and RB867515 to be a conventional sugarcane genotype, has great commercial matter in Brazil and have shown similar results to PRBIO-172. The second chapter, the gene expression of NRT1.1 and NRT2.1 was evaluated in the two nitrogen doses previously evaluated. For this experiment, it was achieved a higher gene expression, and consequently, better nitrogen uptake, for the two genes and in the three genotypes evaluated at the highest concentration of ammonium nitrate.

Keywords: RT-PCR; *Saccharum spp*; plant growth; nitrogen.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MÉDIAS DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE NRT 1.1 E NRT2.1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) SUBMETIDOS A NITRATO DE AMÔNIO NAS DOSES 0,5 mM E 5 mM.....	62
--	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: MÉDIAS DOS GENÓTIPOS PARA OS PARÂMETROS: ALTURA ATÉ A FOLHA + 1, MASSA SECA DA PARTE AÉREA, MASSA SECA DE RAIZ E DIÂMETRO DE COLMO.....	45
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: SOLUÇÃO NUTRITIVA USADA COMO TRATAMENTO PARA AS DOSES BAIXA (0,5 mM) E ALTA (5 mM) DE NITRATO DE AMÔNIO.....41

TABELA 2: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS 16 GENÓTIPOS DE CANA ENERGIA E 2 DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AS DOSES DE 0,5 mM e 5 mM DE NITRATO DE AMÔNIO.....42

TABELA 3: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE GENÓTIPOS PRBIO-137, PRBIO-172 E RB867515 SUBMETIDOS AS DOSES DE 0,5 mM E 5 mM DE NITRATO DE AMÔNIO.....58

TABELA 4: MÉDIAS DO DESEMPENHO DE TRÊS GENÓTIPOS SUBMETIDOS A DUAS DOSES DE NITRATO DE AMÔNIO (0,5 mM E 5 mM)60

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR.....	17
2.2 CANA ENERGIA	19
2.3 NITROGÊNIO NA CANA-DE-AÇÚCAR	21
2.4 TRANSPORTADORES DE NITRATO.....	23
3 REFERÊNCIAS.....	25
4 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA ENERGIA E CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES A DUAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE AMÔNIO COM BASE EM PARÂMETROS AGRÔNOMICOS	37
4.1 INTRODUÇÃO	39
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.2.1 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS AGRONÔMICOS.....	40
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.4 CONCLUSÃO.....	46
5 REFERÊNCIAS.....	46
6 PARÂMETROS AGRÔNOMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITRATO NRT1.1 E NRT2.1 NOS GENÓTIPOS PRBIO- 137, PRBIO-172 E RB867515	50
6.1 INTRODUÇÃO	52
6.2 MATERIAL E METÓDOS.....	53
6.2.1 PARÂMETROS AGRONÔMICOS DOS GENÓTIPOS PRBIO-137, PRBIO-172 E RB867515.....	53
6.2.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	54
6.2.3 RESSUSPENSÃO DO RNA.....	55
6.2.4 INATIVAÇÃO DA DNASE	55
6.2.5 CONVERSÃO EM CDNA.....	56
6.2.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITROGÊNIO.....	56
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
6.4 CONCLUSÃO.....	63
6 CONCLUSÕES FINAIS	63

8 REFERÊNCIAS.....	64
9 ANEXOS	70

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção canavieira constitui uma das atividades econômicas mais antigas do Brasil e está presente em grande parte do território nacional, devido ao país apresentar condições climáticas favoráveis ao cultivo (CONAB, 2019).

Para melhorar a produção, a cultura de cana-de-açúcar depende da prática de manejo de adubação, a qual visa garantir boas condições nutricionais para o crescimento vegetal. Nesse contexto, o nitrogênio, um dos principais meios de adubação, é visto como essencial para as plantas por compor diferentes biomoléculas, tais como adenosina trifostato (ATP), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH), clorofila, proteínas e enzimas (HARPER, 1994; FRANCO et al., 2008).

São encontradas no solo duas formas de nitrogênio, a orgânica e inorgânica. Ambas são afetadas por fatores como mobilidade no solo e eficiência do uso do nutriente pelas plantas. Em cana-de-açúcar, a falta de nitrogênio influencia em fatores de produtividade. No entanto, há falta de evidências sobre a quantidade ideal na adubação e de estudos sobre o uso eficiente do nitrogênio para as diversas variedades plantadas no Brasil (FRANCO et al., 2008; TAGEDER; RENTSCH, 2010).

A absorção desse nutriente é feita por meio de transportadores de nitrato e amônio, forma mineral do nitrogênio. Desta forma, esses transportadores estão envolvidos na eficiência de absorção do nitrogênio por plantas (MAATHIUS, 2009).

Outro ponto importante é o aproveitamento do nitrogênio presente nos fertilizantes. Esse, se apresenta baixo dentro do cultivo de cana-de-açúcar quando comparado a outras culturas. Os números obtidos para a cana-de-açúcar dificilmente são superiores a 40% (CANTARELLA; TRIVELIN; VITTI, 2007).

Por demonstrar altos níveis de conversão de energia luminosa em energia química, a cana-de-açúcar se torna importante fonte de energia renovável (TEW; COBILL, 2008). Atua como principal substituta ao uso de combustíveis fósseis. Além disso, a sacarose obtida da cana-de-açúcar tem sido durante anos a principal forma de fermentação alcoólica na produção de etanol no Brasil. Isso, faz com que programas brasileiros de melhoramento genético de cana-de-açúcar, deem ênfase na obtenção de variedades com altos teores de sacarose.

Atualmente, há o interesse em produção de etanol e cogeração de energia, fatores esses que estimulam buscas a novas variedades de cana-de-açúcar que possuam maiores teores de fibra aliado a produtividade e produção (SILVEIRA, 2014).

Essas variedades são denominadas de cana energia (*energy cane*) e podem ser compostas com mais de 30% de fibra. Por consequência, essas plantas possuem alta produção de biomassa total, importante composto da produção de etanol de segunda geração e produção de eletricidade (TEW; COBILL, 2008).

Em um cenário biotecnológico, a cana energia apresenta desejáveis características na produção de etanol de segunda geração e na produção de energia. (ROSSETTO, 2012; DAROS et al., 2016),

Portanto, o objetivo geral do trabalho foi de avaliar a resposta de duas doses de nitrato de amônio, dose baixa (0,5 mM) e alta (5 mM) em parâmetros agrônômicos atrelado a resposta de expressão gênica de transportadores de nitrato em genótipos de cana-de-açúcar e cana energia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) tem origem descrita no sudoeste asiático, na ilha de Nova Guiné, localizada no oceano pacífico (DANIELS; ROACH, 1987; MOREIRA et al., 2008). Inicialmente, foi utilizada como planta ornamental até expandir território por meio das migrações populacionais, e posteriormente ter aparecido como planta produtora de açúcar na Índia (MIRANDA, 2008).

A cultura possui distribuição em regiões tropicais e subtropicais do globo e tem importância maximizada pelo amplo uso na produção de biocombustíveis, energia e açúcar alimentício (GOLDENBERG, 2007; MOREIRA et al., 2008; ARRUDA, 2011; TRENTIN et al., 2011).

Sobre a importância da espécie no cenário brasileiro, a cana-de-açúcar é uma das primeiras culturas agrícolas introduzidas no país, sendo inserida pelos portugueses no sec. XVI, em território nordestino, devido a esse local apresentar boas condições climáticas. Como consequência dessa ação portuguesa, a cultura está presente em todas as fases históricas da economia brasileira. Sendo então,

considerada o *commodity* de maior contribuição para a balança comercial. E também, ser considerada como fonte de empregos diretos e indiretos para brasileiros (KORB, 2006; LIMA; COSTA, 2007; UNICA, 2012).

A respeito da biologia da cana-de-açúcar, existem diferentes estádios fenológicos conhecidos, sendo esses: brotação e emergência, perfilhamento, crescimento de colmos e maturação dos colmos. Todos amplamente estudados e de importância para o aumento de produtividade e rendimento econômico na cana-de-açúcar (GASCHO; SHIH, 1983; MATSUOKA et al., 2009; UNICA, 2012).

A exploração agroeconômica da cana-de-açúcar foi inicialmente aplicada a espécie *S. officinarum* ou “cana nobre”, devido ao alto acúmulo de sacarose. Entretanto, a espécie se mostrou suscetível ao aparecimento de doenças, o que ampliou o uso comercial para as outras espécies de *Saccharum spp.* Deste modo, deu início a cruzamentos e retrocruzamentos, iniciando assim o melhoramento genético da cultura (DANIELS; ROACH, 1987).

Ao aplicar estudos genéticos na exploração da espécie, atribuiu-se a utilização do termo “complexo *Saccharum*”, o qual possui a descrição de cinco espécies: *Saccharum officinarum*, *Saccharum spontaneum*, *Saccharum sinensis*, *Saccharum barberi* e *Saccharum robustum*. Esse termo teve o primeiro relato em 1957, pelo pesquisador Mukherjee, que, por meio de descrições de subgêneros, contribuiu para o melhor entendimento das espécies incluídas no complexo *Saccharum* (MUKHERJEE, 1957).

A respeito da fisiologia da planta, a cana-de-açúcar possui alta produção de biomassa devido ao mecanismo fotossintético C4, o qual confere eficiente conversão de energia luminosa em energia química (MING et al., 2006).

Em 1975, foi criado o Programa Brasileiro de Alcool (PROALCOOL), o qual incentivou a produção de álcool no Brasil. Esse avanço tecnológico fez com que ocorresse aumento de produção interna de álcool anidro e álcool hidratado. A partir de 2001, ocorreu aumento no preço do petróleo, estimulando o crescimento do número de carros *flex*, movidos a álcool e gasolina, e dessa forma, a produção de álcool no país cresceu de forma rápida (WALTER et al., 2006; ABREU et al., 2011).

Detentor de maior parte das exportações de açúcar mundiais e com baixos custos de produção quando comparado com outros países, a cana-de-açúcar coloca o Brasil como maior produtor e exportador de açúcar (SOUZA et al., 2016; MACEDO 2005).

Atrelado a esses dados, programas de melhoramento genéticos surgem na pesquisa brasileira, e visam a produção de variedades que proporcionem maior produtividade e ganhos de potencial de rendimento (DAROS et al., 2016). Investimentos na produção e rendimento de lavouras de cana, desenvolvem pesquisas que produzem variedades de cana-de-açúcar que respondam a demandas como resistência a doenças e adaptação a ambientes restritivos (DUTRA FILHO et al., 2011; CONAB, 2019).

2.2 CANA ENERGIA

Com a futura premissa de escassez nas reservas de petróleo mundiais e os impactos ambientais causados pela extração e uso de petróleo, diferentes fontes de energia surgem como alternativas renováveis para produção e cogeração de energia. Deste modo, a biomassa se apresenta como uma das promessas de matriz energética (TEW; COBILL, 2008; RIDESA, 2015).

Essa biomassa é um recurso renovável de origens orgânica, animal ou vegetal e que pode ser utilizada na produção energética. Em cana-de-açúcar, essa biomassa é resultado do bagaço e da palha, e esses, se tornam matéria prima de caldeiras, gerando termo energia e geração de eletricidade (TEW; COBILL, 2008).

A energia fornecida pela biomassa está relacionada a celulose, polissacarídeo que compõe a parede celular de vegetais e constitui de 35% a 45% da biomassa. Além disso, a hemicelulose também é um polissacarídeo que representa de 15% a 35% da biomassa vegetal (ROCHA et al., 2012).

Atualmente, o principal etanol utilizado é o provindo do caldo de cana-de-açúcar (etanol de primeira geração), esse combustível possui como características os custos e índices de poluição baixos. Além disso, a cana-de-açúcar possui a palha e bagaço, os quais se apresentam como fonte energética na produção de etanol de segunda geração (SANTOS et al., 2012a).

Com o uso do bagaço da cana-de-açúcar para produção de etanol, programas de melhoramento da cultura em diversos locais do mundo, Brasil incluído, focam em genótipos de cana-de-açúcar que possuam maiores índices de biomassa (SANTOS et al., 2012, SILVEIRA et al., 2016).

Nesse contexto, a cana energia é um híbrido de variedades comerciais com a cana-de-açúcar selvagem. Esses híbridos possuem a capacidade de apresentar em

torno de 30% de fibras, 13% de açúcares e 65% de água. Além de características de interesse ao mercado produtor, como resistência a pragas e adaptações fisiomorfológicas (TEW; COBILL, 2008; KIM; DAY, 2011; SHIELDS; BOOPATHY, 2011).

As espécies do complexo *Saccharum*: *S. spontaneum* e *S. robustum* apresentam maior acúmulo de fibras, sendo então usadas na obtenção de variedades de cana energia. Essas espécies são escolhidas por apresentarem robustez, resistência a pragas, vigor elevado e boa capacidade de perfilhamento. Além disso, existe um contrabalanço entre teores de fibras e índices de sacarose (BULL; GLASZIOU, 1963; D'HONT et al., 1995; MATSUOKA et al., 2014).

Autores como Alexander (1985) e Tew e Cobill (2008) caracterizam a cana energia como uma variedade voltada para regiões de clima temperado, onde há temperaturas mais baixas e menor acesso a água. Outra diferença que as variedades de cana energia apresentam é o desenvolvimento de rizoma. Essa estrutura, caracterizada como um colmo de contato direto com o solo, é capaz de originar uma nova planta. Essa característica morfológica é vista na cana-de-açúcar selvagem, mas devido a evolução e seleção realizada pelo ser humano, foi perdida.

Esse rizoma promove maior vigor e crescimento, acarretando em maior profundidade e absorção de nutrientes e água pela planta. Como resultado dessa morfologia, as plantas de cana energia são também plantas de maior produtividade (MARIANO, 2015).

Aliados ao fator de produção de fibras e por demonstram maiores níveis de tolerância ao frio, requerimento de menores quantidades de fertilizantes e acesso à água, a cana energia demonstra ter potencial para ser plantada em solos de qualidade mais baixa do que a cana-de-açúcar convencional (ZHENG et al., 2009; SOUZA et al., 2013).

A exemplo disso, nos Estados Unidos (EUA) utiliza-se a cana energia ao norte do país, sendo esse território de temperaturas mais baixas. Os EUA consideraram a cana energia como “amiga do ambiente” por necessitar de menores quantidades de fertilização, herbicidas, pesticidas e irrigação (QIU et al., 2012; SALASSI, 2014).

Adicionado aos ganhos de fibras e maior robustez, a cana energia apresenta replante em 10 anos, 7 anos a mais que as variedades convencionais de cana-de-açúcar (CARVALHO-NETO et al., 2014).

Portanto, são descritos três ideótipos de cana-de-açúcar e seus respectivos teores de fibras e açúcares, sendo esses: cana-de-açúcar convencional, com 12% de fibra e 13% de açúcares; a cana energia tipo I, com teores de fibra em 17% e teores de açúcares iguais ou próximos a cana-de-açúcar convencional. Por último, a cana energia tipo II com 30% de fibras com 5 % de sacarose (TEW; COBILL, 2008; PEREIRA, 2017).

2.3 NITROGÊNIO NA CANA-DE-AÇÚCAR

O nitrogênio é constituinte de moléculas como proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucleicos e clorofila. Deste modo, relacionado a processos fisiológicos de grande importância para a sobrevivência e homeostase de plantas. (MIFLIN; LEA, 1976; TRIVELIN et al., 2002b; KRAPP, 2015).

No solo são encontradas duas formas inorgânicas de nitrogênio, o amônio (NH^{+4}) e nitrato (NO^{-3}), sendo esses provindos da matéria orgânica ou do uso de fertilizantes que na composição tenham nitrogênio adicionado (ARAKI; HASEGAWA, 2006).

No interior da planta, o nitrogênio absorvido é combinado com elementos como carbono, hidrogênio e oxigênio, para então ser metabolizado e constituir moléculas mais complexas (JIN et al., 2015).

Sabe-se que a planta de cana-de-açúcar é capaz de absorver algumas quantidades de aminoácidos (forma orgânica do nitrogênio), mas geralmente possui melhor aceitação pelas formas mineralizadas, havendo destaque para o nitrato (OTTO et al., 2011).

Em geral, plantas se adequam a diferentes quantidades de nitrogênio disposto no solo, responsável por um balanço nutricional de nitrogênio (GOJON et al., 2009).

Com relação a mineralização do nitrogênio, essa, dependente de variáveis ambientais, tais como: temperatura, umidade e aeração do solo e também composição química do solo (VITTI et al., 2008).

O nitrogênio, quando integrado ao solo, sofre diferentes transformações químicas e microbiológicas, as quais podem resultar em perdas de nutriente, o que culmina na diminuição de produtividade vegetal. Nesse contexto, para melhorar o aproveitamento, 40% aproximado na cana-de-açúcar e considerando o custo dos

adubos nitrogenados, é fundamental o desenvolvimento de técnicas de manejo adequados de adubação (FRANCO et al., 2011; VALE et al., 2013).

As perdas do nitrogênio em um sistema de plantação, ocorrem principalmente por lixiviação dos fertilizantes, seguido de escoamento superficial, erosão, volatilização da amônia e desnitrificação. Essas perdas do nitrogênio causam a redução da longevidade e potencial produtivo de uma cultura vegetal (VITTI et al., 2007; BODDEY et al., 2008; FORDE; WALCH-LIU, 2009).

Uma das descobertas de maior importância para os estudos com a molécula de nitrogênio e que rendeu um prêmio Nobel, foi a descrição da síntese de amônia (ERISMAN et al., 2008). Esse é o processo industrial mais importante para a síntese de nitrogênio, e assim, produção adicional de compostos nitrogenados (ureia, ácido nítrico e fertilizante). O processo de redução do nitrogênio atmosférico em amônia por meio do processo industrial de Haber-Bosch (HB) fez com que a produção de fertilizantes nitrogenados promovesse a expansão agrícola que suporta a densidade populacional mundial de mais de 7 bilhões de pessoas (ERISMAN et al., 2008).

A dinâmica do nitrogênio no ambiente é o principal desafio para a otimização de seu uso na cana-de-açúcar. Quando se procura melhorar a resposta do nutriente nas variedades, a busca por genótipos mais eficientes no uso do nutriente é uma alternativa ao aumento da eficiência nutricional. Esse desafio nasce da demanda de se diminuir os altos custos dos fertilizantes nitrogenados para a cadeia produtiva da cana-de-açúcar no Brasil (DAROS et al., 2016).

A resposta do nitrogênio na planta de cana-de-açúcar mostra que rebrotas (cana soca), apresentam melhor assimilação e uso do nitrogênio do que em cana planta. Contudo, as causas pelas quais existe essa diferença não são totalmente esclarecidas (CARNAÚBA, 1990; CANTARELLA; TRIVELIN; VITTI, 2007; VITTI et al., 2007).

Uma das respostas científicas para a melhor assimilação de nitrogênio pela cana soca é devido a palha produzida pela cana-de-açúcar logo após o corte, promover lenta liberação de nitrogênio no solo e então promover o desenvolvimento vegetal inicial (SILVEIRA; CROCOMO, 1990; FRANCO et al., 2011).

A respeito da dinâmica da prática de adubação nitrogenada utilizada pelos produtores de cana-de-açúcar no Brasil, sabe-se que as aplicações de doses de fertilizantes nitrogenados são muito inferiores às de outros países também produtores de cana-de-açúcar (CANTARELLA; TRIVELIN; VITTI, 2007).

As respostas observadas em cana-de-açúcar devido a aplicação de nitrogênio são de aumento no perfilhamento dos colmos, aumento do período de ciclagem das plantas, aumento na produtividade de colmos, além de desempenhar papel de sinergia na absorção de outros nutrientes requeridos pela planta (FELLER; FISCHER, 1994; VITTI et al., 2005; MALAVOLTA, 2006; MARIANO et al., 2012).

Ressalta-se que o excesso de nitrogênio no ambiente é responsável por altas emissões de gases efeito estufa e demonstra potencial contaminante para águas de superfície e subterrâneas (QUEIROZ et al., 2010).

Deste modo, existe a necessidade de manejo sustentável de fertilizantes agrícolas, especialmente na redução e/ou na distribuição individualizada dos nutrientes: nitrogênio, fósforo e potássio (CARNEIRO et al., 2017).

Com intuito de melhorar o uso de fertilizantes nitrogenados na produção de cana-de-açúcar, e conseqüentemente aumento na eficiência no uso desse nutriente pela cultura, é fundamental conhecer os momentos de maior absorção melhor forma de absorção pelas plantas. Em cana soca, há estudos que afirmam haver maior extração de nitrogênio proveniente do fertilizante no início do desenvolvimento da cultura, 90 dias após a rebrota (FRANCO et al., 2011).

2.4 TRANSPORTADORES DE NITRATO

O nitrogênio está presente no solo na forma mineral como nitrato e amônio (NO_3 e NH_4) e na forma orgânica como aminoácidos. Dentre as duas formas minerais, o nitrato é a forma mais abundante e móvel no solo (JIN et al., 2015).

Dentre as formas orgânicas e inorgânicas do nitrogênio, as grandes culturas absorvem majoritariamente a forma de nitrato para desenvolvimento vegetal. Mas junto disso, apresentam baixo uso do nutriente e também capacidade baixa de estocar o nitrato (WANG et al., 2019).

O nitrato é absorvido tanto pela parte aérea, quanto via raízes. Em raízes, local de maior absorção, ocorre por meio de diversas famílias de genes que codificam proteínas transportadoras de nitrogênio (TSAY et al., 2007; WANG et al., 2019).

Após a absorção via raízes, há um processo celular de assimilação do nitrogênio. Esse processo, ocorre com a redução do nitrato para amônio, pela atuação das enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) até ser absorvido

como aminoácidos pela atuação de enzimas sintase glutamato (GOGAT) e sintase glutamina (GS) (TSAY et al., 2007; VITAL; GUTIERREZ, 2008).

A absorção do nitrato é efetuada por proteínas transportadoras, localizadas na membrana plasmática. Portanto, há genes envolvidos na síntese proteica. Esses genes de transportadores são reconhecidos e estudados a mais de 20 anos, para elucidar qual o caminho da absorção do nitrogênio em plantas, e assim, compreender o metabolismo vegetal (MAATHIUS, 2009).

A absorção de nitrato é feita pela família de transportadores NRT (*Nitrate Transporters*) e o amônio pela família gênica AMT (*Ammonium transporters*). Essas famílias gênicas operam em alta e baixa concentração de nitrogênio no solo e possuem diversas isoformas em diferentes espécies vegetais (FERNANDES; SOUZA, 2006; ARAKI; HASEGAWA, 2006)

Atualmente, há descrição de quatro famílias de genes que codificam proteínas transportadores de nitrogênio: NRT1, NRT2 (*Nitrate Transporters*) CLC (*Chloride channels*) e SLAC/SLAH (*Slow anion channel*). Essas famílias de genes são estudadas e identificadas em diferentes espécies vegetais, com o objetivo de elucidar o mecanismo de ação desses genes no metabolismo (FAN et al., 2017).

A família NRT1, também é nomeada como família NPF, e é dividida em 8 a 10 subfamílias, as quais são encontrados 53 genes em *Arabidopsis* e 93 genes em arroz (LERAN et al., 2014; VON WITTGENSTEIN et al., 2014). Além disso, foi observada e avaliada em diversas culturas, como: de arroz, pepino e café (CRAWFOR; GLASS, 1998; MEDA et al., 2009).

As isoformas da família NRT são encontradas nas raízes. O sistema de captação do nitrato pela planta é dividido em transportadores de baixa afinidade “*low-affinity transport system*” (LATS) < 1 mM e o de alta afinidade “*high-affinity transport system*” (HATS) >1 mM. As famílias gênicas de NRT são as mais caracterizadas como de dupla afinidade pelo nitrato, sendo que isso proporciona maiores concentrações de nitrato disponíveis no ambiente (MILLER et al., 2007; FERNANDES; SOUZA, 2006; BAI et al., 2013).

O primeiro transportador de nitrato identificado foi o NRT 1.1 na planta modelo de *Arabidopsis*. Esse gene é também conhecido como CHL 1 ou NPF 6.3. Como características desse gene, pode-se ver a dupla afinidade por nitrato, serve como sensor de concentração de nitrato no solo, então atua na expressão gênica de outros genes de transporte, como o NRT2.1 (TSAY, 2013).

É capaz também de sinalizar quebra de dormência, regulação do enraizamento adventício e crescimento de folhas (KROUK et al., 2010; HSU; TSAY, 2013).

A família genica NRT1 ou *peptide transporter* (PTR) foi renomeada em 2014 por Leran e colaboradores. Os pesquisadores incluíram nessa família o gene NRT 1.1 e fizeram uma subdivisão de 10 famílias as quais englobam outros nutrientes absorvidos por esses genes além do nitrato.

Há membros da família NRT1 que atuam apenas baixa afinidade por nitrogênio (AtNRT1.2) (HUANG et al., 1999) e outros regulam a passagem do nitrato das raízes para parte aérea (NRT1.5; NRT1.8 e NRT1.9) (WANG et al., 2012).

Através do uso da biologia molecular e do sequenciamento de genomas, foi possível identificar em *Arabidopsis* sete prováveis genes que codificam transportadores de nitrato com afinidade alta. Além disso, a expressão gênica se mostra dependente do suprimento externo de nitrato (OKAMOTO et al., 2003; GIRIN et al., 2007).

Outra subfamília de transportadores de nitrato importante é a NRT2. Essa família apresenta quase todos os genes expressos em raízes, com exceção de AtNRT 2.7 que é mais expresso em folhas

A subfamília NRT2 apresenta dependência de outra subfamília NRT3 (NAR 2) para que ocorra assimilação de nitrato. De mesmo modo que NRT1, a família NRT2 foi descrita em plantas de *Arabidopsis* e arroz (FENG et al., 2007).

Ademais, genes como NRT2.1 e NRT2.2 se mostram responsáveis por em torno de 80% do transporte de nitrato, quando o nutriente está em doses micromolares (LIU et al., 2007).

Portanto com o estudo dos genes que codificam proteínas transportadoras de nitrato é possível elucidar qual o percurso, forma e potencial de absorção do nitrogênio até a metabolização final pela planta (BREDEMEIER; MUNDSTOCK, 2000; RENTSCH et al., 2007).

3 REFERÊNCIAS

ALEXANDER, A.G. **The Energy Cane Alternative**. Elsevier, Sugar Series, Vol. 6., 1985.

ARAKI, R. & HASEGAWA, H. **Expression of Rice (*Oryza sativa* L.) Genes Involved in High- Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction.** *Breeding Science*, v. 56, p. 295-302, 2006.

ARRUDA, P. **Genetically modified sugarcane for bioenergy generation.** *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p. 315-322, 2011.

BAI, H.; EURING, D.; VOLMER, K.; JANZ, D.; POLLE, A. **The Nitrate Transporter (NRT) Gene Family in Poplar.** *Plos One*, v. 8, 2013.

BODDEY, R. M.; SOARES, L. H. B.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. **Bioethanol production in Brazil.** In: PIMENTEL, D. (Ed.). *Renewable energy systems: Environmental and Energetic Issues*. 1. ed. New York: Springer, p. 321–356, 2008.

BULL, T. A.; GLASZIOU, K. T. **The evolutionary significance of sugar accumulation in *Saccharum Australian*.** *Journal of Biological Science*, v. 16, p. 737-742, 1963.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. **Nitrogênio e enxofre na cultura da cana-de-açúcar.** In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Eds.). *Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira*. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute. p. 349–412, 2007.

CARNAÚBA, B.A.A. **O nitrogênio e a cana-de-açúcar.** *STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos*, v. 8, p. 24-41, 1990.

CARNEIRO, F, M.; FARLANI, C. E. A.; ORMOND, A. T. S.; KAZAMA, E. H.; SILVA, R. P. **Mechanized Fertilization: Individual Application of Nitrogen, Phosphorus and Potassium in Sugarcane.** *Revista ciência agronômica*, v. 48, n. 2, p. 278-287, 2017.

CARVALHO- NETTO, V. O.; BRESSIANI, A. J.; SORIANO, L. H.; FIORI, S. C.; SANTOS, M. J.; BARBOSA, V. S. G.; XAVIER, A. M.; LANDELL, G.A. M.; PEREIRA, A. G. G. **The potential of the energy cane as the main biomass crop for the**

cellulosic industry. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, v. 1, n. 20, 2014.

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

CONAB. **Acompanhamento da Safra brasileira: Cana-de-açúcar,** Primeiro levantamento, safra 2018/2019, v. 4, n. 1. P. 1-57, abril, 2019.

DANIELS, J.; ROACH, B. T. **Taxonomy and evolution.** In: HEINZ, D. J. (Ed.). Sugarcane improvement through breeding. Amsterdam: Elsevier, 1987.

DAROS, E.; ZAMBON, C. J. L.; OLIVEIRA, A. R. **Programa de melhoramento da cana-de-açúcar da UFPR: 25 anos de pesquisa.** 1 ed- Curitiba: Graciosa, p. 252, 2016.

D'HONT A.; RAO P.; FELDMANN P.; GRIVET L.; ISLAM-FARIDI N.; BERDING N.; GLASZMANN J. C. **Identification and characterisation of intergeneric hybrids *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and in situ hybridization.** Theor Appl Genet v. 91, p. 320–326, 1995.

DUTRA FILHO, J. A.; MELO, L. J. O. T.; RESENDE, L. V.; ANUNCIAÇÃO FILHO, C. J.; BASTOS, G. Q. **Aplicação de técnicas multivariadas no estudo da divergência genética em cana-de-açúcar.** Revista Ciência Agronômica, Fortaleza, v. 42, n. 1, p. 185-192, 2011.

ERISMAN, J. W.; SUTTON, M. A.; GALLOWAY, J.; KLIMONT, Z., WINIWARTER, W. **How a century of ammonia synthesis changed the world.** Nature Geoscience, n. 1. p. 636-639, 2008.

FAN, X.; NAZ, M.; FAN, X.; XUAN, W.; MILLER, A. J.; XU, G. **Plant nitrate transporters: from gene function to application,** Journal of Experimental Botany, Volume 68, Issue 10, 1 May 2017, p. 2463–2475, 2017.

FELLER, U.; FISCHER, A. Nitrogen-metabolism in senescing leaves. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.13, n.3, p. 241-273, 1994.

FENG S, MARTINEZ C, GUSMAROLI G, WANG Y, ZHOU J, WANG F, CHEN L, YU L, IGLESIAS-PEDRAZ JM, KIRCHER S. **Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins**. *Nature* 451: 475–479, 2008

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. **Absorção de nutrientes**. In: FERNANDES M. S. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 115-152, 2006,

FORDE, P. B. G.; WALCH-LIU. **Nitrate and glutamate as environmental cues for behavioural responses in plant roots**. *Plant, Cell and Environment*, v. 32, p. 682–693, 2009.

FRANCO, H. C. J.; DAMIN, V.; FRANCO, A.; MORAES, M. F.; TRIVELIN, P. C. O. **Perda de nitrogênio pela *Brachiaria decumbens* após a antese: relação com a umidade do solo**. *Ciência Rural*, v. 38. P. 96-102, 2008.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. **Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions**. *Field Crops Research*, v. 121, p. 29-41, 2011.

GIRIN T, LEJAY L, WIRTH J, WIDIEZ T, PALENCHAR PM, ET AL. **Identification of a 150 bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant**. *Plant Cell Environ* 30: 1366–1380, 2007.

GOJON A; NACRY P.; DAVID, I.; ANJC. **Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants**. *Current option in Plant biology* v.12. p.328-338, 2009.

GOLDENBERG, J. **Ethanol for a sustainable energy future**. *Science*, v. 315, p. 808- 810, 2007.

HARPER, J.E.; BOOTE, K. J., BENNETT. J. M., SINCLAIR, T. R., **Nitrogen metabolism. Physiology and determination of crop yield.** Madison: ASA/CSSA/SSSA. Chapt.11A. p.285-302, 1994.

HUANG, N. C.; LIU K. H.; LO, H. J.; TSAY, Y. F. **Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake.** Plant Cell 11: 1381–1392, 1999.

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 163, 844–856, 2013.

JIN, Z.; ZHU, Y.; LI, X.; DONG, Y, A. N. Z. **Soil N retention and nitrate leaching in three types of dunes in the Mu Us desert of China.** Scientific Reports 5, 14222, 2015.

KIM M, DAY D. F. **Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology v. 38, p.803–807, 2011.

KRAPP, A. **Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces.** Current Opinion in Plant Biology. v. 25, p. 115-122, 2015.

KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH A, et al. **Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants.** Developmental Cell 18, 927–937, 2010.

KORB, C. C. **Identificação de depósitos tecnogenicos no Reservatório Santa Barbara, Pelotas (RS) Dissertação (Mestrado em Geografia) – Porto alegre, 2006.**

LERAN, S. et al. **A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants.** Trends Plant Science n. 19, v.1, p. 5–9, 2014.

LIMA C.L.; COSTA L. F.; **Considerações sobre o setor sucroalcooleiro no Brasil e na Bahia.** Rev. Desenvolve bahia, v. 6, p. 101-21, 2007.

LIU et al. **Dissection of the AtNRT2.1: AtNRT2.2 Inducible High-Affinity Nitrate Transporter Gene Cluster.** Plant Physio v. 143 (1) p. 425-433, 2007.

MAATHUIS, F. J. M. **Physiological functions of mineral macronutrients.** Current Opinion in Plant Biology, v. 12, p.250-258, 2009.

MACEDO, I. C. **Biomass as a Source of Energy.** Unpublished paper commissioned for the InterAcademy Council study report, Lighting the Way: Toward a Sustainable Energy Future, 2005.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas.** São Paulo, Agronômica Ceres, 638p. 2006.

MANZATTO, C. V.; ASSAD, E. D.; BACCA, J. F. M.; ZARONI, M. J.; PEREIRA, S. E. M. **Zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar: expandir a produção, preservar a vida, garantir o futuro.** Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, **PRODUÇÃO DE AÇÚCAR POR TIPO - SAFRA 2016-17** Acessado em agosto de 2018, https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar/item/download/1208_70e861d4ccc431c8aeb5e9b68d25d2f5, 2016.

MARIANO E, TRIVELIN PCO, VIEIRA MX, LEITE JM, OTTO R, FRANCO HCJ. **Ammonia losses estimated by an open collector from urea applied to sugarcane straw.** Revista Brasileira Ciência e Solo 36:411–419, 2012.

MARIANO, J. **Cana-energia, a revolução sucroenergética está começando.** Acessado em: julho/2019. NovaCana.com, 20 outubro 2015.

MATAKIADIS, T.; RENOU JP, KAMIYA Y, NAMBARA E, TRUONG HN. 2009. **The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy**. *Plant Physiology* 149, 949–960, 2009.

MATSUOKA. S.; ANTHONY J.; KENNEDY, E. GUSTAVO D. DOS SANTOS; ANDRÉ L. TOMAZELA; LUIS CLAUDIO S. RUBIO. **Energy Cane: Its Concept, Development, Characteristics, and Prospect**. *Advances in Botany* v. 2014, p. 13, 2014.

MEDA, A. R.; PEREIRA, L. F. P.; DOS SANTOS, T. B.; CARAMORI, P.; PAVAN, M. A.; VIEIRA, L. G. E. **ANÁLISE IN SILICO DE GENES ENVOLVIDOS NO TRANSPORTE DE NITRATO, AMÔNIO E URÉIA EM CAFEEIRO** VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 2009

MIFLIN, B.J., LEA, P.J. **The pathway of nitrogen assimilation in plants**. *Phytochemistry*, New York, v.15, p.873-885, 1976.

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

MING, R., MOORE, P.H., WU, K.K., D'HONT, A., TEW, T.L., MIRKOV, T.E., DA SILVA, J., SCHNELL, R.J., BRUMBLEY, S.M., LAKSHMANAN, P., JIFON, J., RAI, M., COMSTOCK, J.C., GLASZMANN, J.C. AND PATERSON, A.H. **Sugarcane improvement through breeding and biotechnology**. *Plant Breeding Reviews* v. 27, p. 17-118, 2006.

MIRANDA, J. R. **História da cana-de-açúcar**. Campinas: Komedi. p. 167, 2008.

MOREIRA, A. L.; ALMEIDA, W. S.; SCABBIA, R.R.P. **Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar**. *Teixeira Biológico*, São Paulo, v.70, n.1, p.35-42, 2008.

MUKHERJEE, S.K. **Origin and distribution of *Saccharum***. *Bot. Gaz.* v. 119, p. 55-61, 1957.

OTTO, R.; SILVA, A.P.; FRANCO, H.C.J.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. **High soil penetration resistance reduces sugarcane root system development.** Soil and Tillage Research, v. 117, p. 201-210, 2011.

PEREIRA, G. A. G. **A energia da cana.** Revista Opiniões, Ed abril-junho, Disponível em:<http://sucroenergetico.revistaopinioes.com.br/revista/detalhes/7-energia-da-cana/>, 2017.

QUEIROZ, A. M; SOUZA, C. H. E; MACHADO, V. J; LANA, R. M. Q; KORNDORFER, G. H; SILVA, A. A. **Avaliação de diferentes fontes e doses de nitrogênio na adubação da cultura do milho (*Zea mays* L.).** Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v.10, n.3, p. 257-266, 2011.

QUI, Z.; AITA, M. G.; WALKER, S. M. **Effect of ionic pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse.** Bioresource Technology, v. 117, p251-256, 2012.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2019).

RENTSCH, D.; SCHMIDT, S.; TEGEDER, M. **Transpoters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds,** FEBS Letters, v. 581, p. 2281-2289, 2007.

RIDESA- REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO DO SETOR SUCROENERGÉTICO. **Produção de energia via biomassa pode crescer até 15 % em 2015.** 2015.

ROCHA GJM, MARTIN C, SILVA VFN, GOMEZ EO, GONÇALVES, AR. **Mass balance of pilot-scale pretreatment of sugarcane bagasse by steam explosion followed by alkaline delignification.** Bioresource Technology. v. 111: 447–452, 2012.

ROSSETTO, R. **A bioenergia, a cana energia e outras culturas energéticas.** Pesquisa e Tecnologia. V. 8, n. 1, 2012.

SALASSI, M. E. et al. **Farm-Scale Cost of Producing Perennial Energy Cane as a Biofuel Feedstock.** BioEnergy Research. v. 7, n. 2, p. 609-619, 2014.

SANTOS FA, QUEIRÓZ JH, COLODETTE JL, FERNANDES AS, GUIMARÃES VM, REZENDE ST **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.** Quimica Nova 35: 1004-1010, 2012. A.

SHIELDS, S.; BOOPATHY, R. **Ethanol production from lignocellulosic biomass of energy cana.** International Biodeterioration and Biodegradation. V. 65, p. 142-146, 2011.

SILVEIRA, J.A.G.; CROCOMO, 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, Campinas, v. 2, p. 7-15, 1990.

SILVEIRA, L. C.I.; BRASILEIRO, B. P.; KIST, V. et al. **Selection in energy cane families.** Crop Breeding and Applied Biotechnology. v. 16, p. 298- 306, 2016.

SOUZA AP, LEITE DCC, PATTATHIL S, HAHN MG, BUCKERIDGE MS. **Composition and structure of sugarcane cell wall polysaccharides: implications for second-generation bioethanol production.** Bioenergy Research, 6: 64–579, 2013.

SOUZA, C. A.; VITTI, A. C.; SANQUETTA, C. R.; GAITAROSSA, E. C, **Produção de biomassa da cana-de-açúcar por meio do uso de organominerais em cana planta e cana soca.** BIOFIX Scientific Journal, v.1, n.1, p.38-43, jul. / dez. 2016.

TAGEDER, M.; RENTSCH, D. **Uptake and Partitioning of Amino Acids and Peptids.** Molecular Plant, v. 3, n. 6, p. 997-1011, 2010

TEW, T. L.; COBILL, R. M. **Genetic improvement of sugarcane (*Saccharum spp.*) as na energy crop**. In: Vermerris, W. (Ed.). Genetic Improvement of Bioenergy Crops. Springer Science + Business Media, LLC. New York. p. 273-294. 2008.

TRENTIN, R.; ZOLNIER, S.; RIBEIRO, A.; STEIDLE NETO, A. J. **Transpiração e temperatura foliar da cana-de-açúcar sob diferentes valores de potencial matricial**. Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v. 31, n. 6, p.1085-1095, 2011.

TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W.; GAVA, G.J.C. & SARRIÉS, G.A. **Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura**. Revista Brasileira. Ciência e Solo, 26:636-646, 2002b.

TSAY YF, SCHROEDER JI, FELDMANN KA, CRAWFORD NM. 1993. **The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter**. Cell 72: 705–713, 1993.

TSAY YF, CHIU CC, TSAI CB, HO CH, HSU PK. **Nitrate transporters and peptide transporters**. FEBS Letters 581: 2290–2300, 2007.

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 44: 304–317, 2003.

ÚNICA. União da Indústria da Cana de açúcar. **Estimativa safra 2012/2013**.

VALE, D. W.; PRADO, R. M.; CANTARELLA, H.; FONNSECA, M; AVALHÃES, C. C.; CORREIA, M. A. R.; BARBOSA, M. P. **Ammonium and nitrate in soil and ratoon sugarcane grown in function of nitrogen on oxisol**. Journal of Plant Nutrition. 36, n. 2, p. 201–13, 2013.

VIDAL, E. A.; GUTIERREZ, R. A. **A system view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis**. Current Opinion in Plant Biology 11: 521–529, 2008.

VITTI, D. M. S. S. ; NOZELLA, E. F. ; ABDALLA, A. L. ; BUENO, I. C. S. ; SILVA FILHO, J. C. ; COSTA, C. ; BUENO, M. S. ; LONGO, C. ; VIEIRA, M. E. Q. ; CABRAL FILHO, S. L. S. ; GODOY, P. B. ; MUELLER-HARVEY, I. **The effect of drying and urea treatment on nutritional and anti-nutritional components of browses collected during wet and dry seasons.** *Animal. Nutrition and Feed Technology*, 122 (1-2): 123-133, 2005.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; PENATTI, C. P.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E.; FRANCO, H. C. J. **Produtividade da cana-de-açúcar relacionada ao nitrogênio 11 residual da adubação e do sistema radicular.** *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 42, n. 2, p. 249–256, 2007.

VITTI, A. C. et al. **Mineralização da palhada e crescimento de raízes de cana-de-açúcar relacionados com a adubação nitrogenada de plantio.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, vol. 32, nº spe, p. 2757–62, 2008.

VON WITTGENSTEIN, N. J.; LE, C. H.; HAWKINS, B. J.; EHLTING, J. **Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants.** *BMC Evolutionary Biology* v. 14, p. 11, 2014.

WALTER, A.; DOLZAN, P.; PIACENTE, E. **Biomass energy and bio-energy trade: historic developments in Brazil and current opportunities.** *Sustainable Bio-energy trade; securing Supply and Demand.* State University of Campinas, Campinas, Brazil, 2006.

WANG Y.Y, HSU P.K, TSAY Y.F. **Uptake, allocation and signaling of nitrate.** *Trends Plant Sci* 17: 458–467, 2012.

WANG, J.; YAXIN L.; ZHU, F.; MING R.; CHEN, L. **Genome-Wide Analysis of Nitrate Transporter (NRT/NPF) Family in Sugarcane *Saccharum spontaneum* L.** *Tropical Plant Biology*, 2019.

ZHANG H, JENNINGS A, BARLOW PW, FORDE BG. **Dual pathways for regulation of root branching by nitrate**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 6529–6534. 1999.

ZHENG, Y. I.; PAN, Z.; ZHANG, R.; WANG, D. **Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated saline crops for fermentable sugar production**. Applied Energy, 86, 2459, 2009.

4 SELEÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA ENERGIA E CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES A DUAS CONCENTRAÇÕES DE NITRATO DE AMÔNIO COM BASE EM PARÂMETROS AGRÔNICOS

RESUMO

A procura por combustíveis renováveis que minimizem impactos ambientais, emissão de gases do efeito estufa e a utilização do petróleo, traz grande destaque na utilização da biomassa vegetal no cenário comercial e de pesquisa para combustíveis considerados limpos. Nesse contexto a cana energia, um híbrido de cana-de-açúcar é uma aposta que possui eficiente produção de biomassa. Adicionado a isso, há evidências sobre a cana energia possuir capacidade de ser plantada em locais com solos de baixa fertilidade. Deste modo o trabalho teve por objetivo selecionar genótipos de cana energia e cana-de-açúcar contrastantes ao tratamento de nitrato de amônio (NH_4 ; NO_3) em doses baixa (0,5 mM) e alta (5 mM). O experimento foi conduzido no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, localizada em Curitiba-PR. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 18 genótipos, sendo 16 de cana energia e 2 de cana-de-açúcar em esquema fatorial 18 x 2 (18 genótipos x 2 doses de nitrogênio) com quatro repetições por tratamento. Foram avaliados os parâmetros altura, diâmetro do colmo, massa seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) por 90 dias. O resultado obtido por meio dos parâmetros agrônômicos de massa seca de raízes selecionou o genótipo PRBIO-137, o genótipo com a melhor resposta ao nitrogênio em dose baixa, o genótipo PRBIO-172 como contrastante e o genótipo RB867515 por ser um genótipo de cana-de-açúcar convencional, ter tido resultados similares a PRBIO-172 e ter grande importância comercial no Brasil.

Palavras-chave: Produtividade; crescimento vegetal; uso eficiente de nitrogênio.

GENOTYPES SELECTION OF ENERGY CANE AND SUGARCANE CONTRASTING TO TWO CONCENTRATIONS OF AMMONIUM NITRATE BASED ON AGRONOMIC PARAMETERS

ABSTRACT

The search for sustainable fuels to minimize environmental impacts, emission of greenhouse gases and the use of oil, brings prominence in the use of biomass in the commercial and research areas for clean fuels. In this context, energy cane, a sugarcane hybrid is a hope in efficient biomass production. Added to this, there is evidence that energy cane has the capacity to be cultivated in places with low fertility soils. The work aimed to select genotypes of energy cane and sugarcane with contrast response by the use of ammonium nitrate ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) in low (0.5 mM) and high (5 mM) concentration. The experiment was carried out in the Agricultural Sciences Sector of the Federal University of Paraná, located in Curitiba-PR. The design used was completely randomized (DIC), with 18 genotypes, 16 of energy cane and 2 of sugarcane in factorial scheme 18 x 2 (18 genotypes x 2 doses of nitrogen) with four replicates per treatment. Height at leaf +1, culm diameter, leaves dry matter and root dry matter parameters were evaluated for 90 days. The result obtained through the agronomic parameters selected the genotypes were PRBIO-137, genotype of better response to nitrogen in low concentration, the genotype PRBIO-172 as the contrasting and the genotype RB867515 to be a conventional sugarcane genotype, be a great commercial importance in Brazil and have shown results similar to PRBIO-172.

Key words: Productivity; plant growth; NUE.

4.1 INTRODUÇÃO

A busca de fontes energéticas renováveis surge como forma de a minimizar o uso do petróleo. Com isso, a biomassa vegetal se tornou um recurso renovável de interesse para os mercados produtores de combustíveis (HIMMEL et al., 2007).

Neste contexto, a cana energia, um híbrido de cana-de-açúcar convencional com as espécies selvagens de *S. spontaneum* e *S. robustum* emerge no cenário de produção de combustíveis como plantas de alta produção de biomassa e conseqüentemente, produção de etanol de segunda geração (O'BRIEN; SUSZKIW, 2012; FEDENKO, et al., 2013).

A cana energia é uma planta C4, que acarreta em um sistema fotossintético eficiente na produção de biomassa. As plantas C4 apresentam como características melhores taxas de aproveitamento de luz solar, água e de absorção de nutrientes do que plantas com sistema fotossintético C3 (RICHARD, et al., 2008).

Adicionado ao fator de produção de biomassa, a cana energia também apresenta características de ser plantada em locais pobres em nutrientes e em áreas com erosão de solo, locais esses impróprios para as variedades de cana-de-açúcar comerciais (SHIELDS; BOOPATHY, 2011).

A cultura de cana-de-açúcar conta com o uso de adubação nitrogenada como parte do bom manejo. Entretanto, a dinâmica do nitrogênio no ambiente é o principal desafio para a otimização de seu uso na cana-de-açúcar. Quando se procura melhorar a resposta do nutriente nas variedades, a busca por genótipos mais eficientes no uso do nutriente é uma alternativa ao aumento da eficiência nutricional. Desse desafio nasce a demanda de se diminuir os altos custos dos fertilizantes nitrogenados para a cadeia produtiva da cana-de-açúcar no Brasil (DAROS et al., 2016).

Há diversas formas de mensurar a produtividade e potencial biotecnológico de uma cultura, portanto, caracteres agrônômicos como altura, diâmetro e massa seca proporcionam identificar diferentes fases de desenvolvimento em diferentes ambientes de cultivo. O que permite manejar diferentes formas e quantidades de adubação (MAGALHÃES, 1985; STONE et al., 1999).

Essas metodologias de estudo possibilitam a avaliação de diversas características relacionadas a produtividade e capacidade produtiva. Também possibilitam melhorar a utilização do ambiente ao qual a cultura está exposta. Os

dados provindos de caracteres agronômicos estimam variações em diferentes níveis de produção e também levam em conta fatores como plantas geneticamente diferentes e plantas expostas a diferentes ambientes de produção (MAGALHÃES, 1997; PEIXOTO et al., 2011).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi selecionar genótipos de cana energia respostas contrastantes a doses baixa (0,5 mM) e alta (5mM) de nitrato de amônio.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 AVALIAÇÃO DE PARAMÊTROS AGRONÔMICOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (latitude -25.410382 e longitude 49.249242 S) com altitude média de 934 m.

Foram utilizados toletes de 18 genótipos de cana-de-açúcar, provenientes do Programa de Melhoramento de Cana-de-açúcar- UFPR, localizado em Paranavaí-PR. Os toletes, com uma gema axilar viável, sem necrose ou oxidação, foram acondicionados para germinação a 36°C e alta umidade por 3-5 dias, em Curitiba-Pr.

Após a germinação do material, os toletes foram transferidos para vasos de 5 litros, com areia e vermiculita de granulometria fina na proporção de 1:1 (sendo esse um substrato pobre em nutrientes) pelo período total de 90 dias.

Dentro dos 90 dias de experimento, os 30 primeiros dias, serviram para esgotamento de reservas endógenas dos toletes. Durante esse período, os toletes, foram supridos de 350 ml de água deionizada conforme necessidade das plantas. Nos 60 dias restantes, foi feito uso dos tratamentos com solução nutritiva, proposta por Sarruge (1975) com doses de 0,5 mM e 5 mM de nitrogênio na forma de nitrato de amônio (TABELA 1).

TABELA 1: SOLUÇÃO NUTRITIVA USADA COMO TRATAMENTO PARA AS DOSES BAIXA (0,5 mM) E ALTA (5 mM) DE NITRATO DE AMÔNIO.

Composto	Peso Molecular	Concentração estoque	Concentração estoque	20 L (0,5 mM)	20 L (5 mM)
	g mol ⁻¹	Mm	g L ⁻¹	MI	MI
NH₄NO₃	80,05	1000	80,05	5	50
CaCl₂	110,98	1000	110,98	80	80
KH₂PO₄	136,08	1000	136,08	40	40
MgSO₄ 7(H₂O)	246,47	500	123,24	40	40
NaFeDTPA	558,5	53,7	30	40	40
MICRONUTRIENTE S					
KCL	74,75	25	1,864	-	-
H₃BO₃	61,83	12,5	0,773	-	-
MnSO₄ H₂O	169,01	1	0,169	40	40
ZnSO₄ 7(H₂O)	287,54	1	0,288	-	-
CuSO₄ 5(H₂O)	249,68	0,25	0,062	-	-
Na₂MoO₄	205,92	0,25	0,05	-	-

Fonte: Sarruge (1975), modificado pelo autor (2020).

O experimento realizado teve delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 18 x 2 com quatro repetições. Utilizaram-se 16 genótipos de cana energia e 2 de cana-de-açúcar convencional para as concentrações de 0,5 mM e 5 mM de nitrogênio inorgânico em forma de nitrato de amônio.

Os parâmetros utilizados para avaliar a resposta ao tratamento foram: Altura folha +1, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e diâmetro do colmo. A medição de altura foi feita por meio de régua milimétrica a partir do solo até a inserção da folha +1. O diâmetro do colmo foi realizado com o uso de um paquímetro digital, na altura de 5 cm do solo. As massas secas tanto da parte aérea quando raízes foram realizadas com o uso de balança de precisão. Sendo realizada secagem prévia a 65°C em estufa, para então realizar a pesagem.

Após as coletas de dados, esses foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade. Respondendo a esses testes, foi realizada a análise de variância e as médias agrupadas pelo teste Skott-knott a nível de significância de 5%. Todas as

análises estatísticas foram realizadas com o uso do software R e uso do pacote de dados *ExpDes.pt*. Os parâmetros de altura e MSPA foram transformados com a função BOX-COX para cumprir os pressupostos da anova (FERREIRA et al., 2018; R CORE TEAM, 2019).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os 90 dias de experimento em casa de vegetação, foi verificado que apesar de não ter ocorrido efeito nos fatores genótipos e doses de nitrogênio em separado, houve efeito de interação entre os genótipos estudados e as doses de nitrogênio para todos os parâmetros testados (p -valor $\leq 0,05$) (TABELA 2).

TABELA 2: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DOS 16 GENÓTIPOS DE CANA ENERGIA E 2 DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS AS DOSES DE 0,5 mM e 5 mM DE NITRATO DE AMÔNIO.

Fontes de Variação	GL	Quadrado Médio			
		ALTURA	MSPA	MSR	DIÂMETRO
		Cm	g	g	Cm
Genótipos	17	13,34 ns	1,02 ns	11,00 ns	15,51 ns
Doses	1	122,36 ns	7,17 ns	1,17 ns	42, 53 ns
Genótipos x Doses	17	5,51 *	0,30 *	5,60 *	3,49 *
Resíduo	108	1,36	0,14	2,90	1,73
Coefficiente de Variação (%)		13,99	64,05	42,59	17,99

Legenda: ns: não significativo a 5%; *: significativo a 5%; **: significativo a 1%.

Fonte: O autor (2020).

Foi observado por meio do desdobramento do teste que houve ganho de altura em dez dos dezoito genótipos utilizados, quando feito o aumento na concentração de nitrato de amônio. Entretanto, o genótipo PRBIO-137 foi o único que obteve diminuição de altura na dose de 5 mM (QUADRO 1).

Pelo teste de Scott-Knott, foi obtido na variável altura, três agrupamentos para ambas as doses, sendo possível destacar o genótipo PRBIO-54 como a menor média na dose 5 mM e sendo o único de um dos agrupamentos formados pelo teste (QUADRO1).

A medição da altura foi usada por ser importante parâmetro de desenvolvimento vegetativo em cana-de-açúcar. Além disso a altura é considerada marcador de crescimento da atividade metabólica, taxa de fotossíntese e acúmulo de sacarose na planta (VALSECHI, 1983; OLIVEIRA et al., 2019).

O parâmetro massa seca da parte aérea (MSPA) apresentou por meio do desdobramento do teste dez genótipos com ganho de massa seca quando utilizado a concentração mais alta de nitrato de amônio, sendo o genótipo de maior ganho de MSPA com o aumento da concentração de nitrogênio, o genótipo PRBIO-60 (QUADRO 1).

O teste de Skott-knott, apresentou na dose de 0,5 mM dois agrupamentos de genótipos, sem haver genótipos de destaque. Enquanto que a concentração de 5 mM formou três agrupamentos, sendo o grupo de menores médias formado pelos genótipos PRBIO-221 e PRBIO-134 (QUADRO1).

O parâmetro de massa seca de raiz obteve por meio do desdobramento do teste estatístico, o genótipo PRBIO-137 sendo mais uma vez o único a ter o maior acúmulo de massa seca na concentração baixa de nitrogênio. Em sequência, apenas o genótipo PRBIO-60 obteve ganho significativo de massa seca com o uso da dose mais alta de nitrogênio. O teste de Skott-knott teve por resultado dois agrupamentos nas duas doses de nitrato de amônio estudados (QUADRO 1).

Foram avaliados os acúmulos de massa seca devido à importância no crescimento vegetal. Conseqüentemente, MSR e MSPA, dependem de fatores como variedade vegetal e nitrogênio no solo, sendo esses pressupostos de avaliação do trabalho (SUGUITANI; MATSUOKA, 2001).

É conhecido que o acúmulo de massa seca no crescimento vegetal é dividido em quatro etapas. Sendo essas as etapas de: espera, crescimento logarítmico, crescimento linear e crescimento estacionário. Com isso, em cana-de-açúcar, a primeira fase apresenta acúmulo de massa seca em torno de 6% na parte aérea, seguido de taxas de 81% na fase logarítmica e 13% na fase linear (GAVA et al., 2001). Demonstrando a importância de se mensurar o acúmulo de massa seca tanto raízes, quanto da parte aérea.

O parâmetro massa seca de raízes foi utilizado por estar envolvido com a arquitetura e crescimento do sistema radicular, e esse fator ter ligação direta com proteínas transportadoras de nitrogênio e conseqüentemente absorção desse nutriente (LIU; TSAY, 2015).

Mensurar o ganho de massa seca serve como forma de análise de dados de crescimento inicial, tanto em espécies arbóreas como agrícolas, e indicam aumento na biomassa acumulada (SANTOS et al., 2009; BORGES et al., 2011; OLIVEIRA; GUALTIERI, 2011). Destacando o uso dos parâmetros no estudo do desenvolvimento de cana energia.

Além disso, em condições de campo e casa de vegetação, pesquisas com cana-de-açúcar convencional usam medições de massa seca para avaliar o efeito do nitrogênio (BOLOGNA-CAMPBELL, 2007; JUNIOR, 2011). Isso explica, a fase inicial de desenvolvimento da cana-de-açúcar haver maior fitomassa revertida para o crescimento foliar, e conseqüentemente para o perfilhamento (GAVA et al., 2001).

O parâmetro diâmetro apresentou por meio do desdobramento do teste sete dos dezoito genótipos que demonstraram ganho de diâmetro de colmo com o aumento na concentração de nitrogênio. A grande maioria dos genótipos apresentaram diâmetro de colmo iguais nas duas concentrações de nitrogênio (QUADRO 1).

Por meio do teste de Skott-knott foi obtido três agrupamentos de genótipos na concentração de 0,5 mM e dois agrupamentos na concentração de 5 mM (QUADRO 1).

O parâmetro diâmetro de colmo foi utilizado na avaliação por ser envolvido no desenvolvimento vegetativo e acúmulo de sacarose em cana-de-açúcar (VALSECHI, 1983; OLIVEIRA et al., 2019).

Autores como Oliveira e colaboradores (2004), descreveram que nos primeiros 135 dias após o plantio em campo, variedades de cana-de-açúcar não demonstram diferença significativa no diâmetro de colmo. Podendo isso explicar a maioria dos genótipos com diâmetro igual nas duas concentrações de nitrato de amônio.

Os parâmetros agrônômicos usados no trabalho são relacionados ao crescimento vegetal. Estuda-los proporciona uma análise primária de produção, sem a necessidade de equipamentos sofisticado, acarretando em conhecimento da

ecologia e fisiologia vegetal (KVET et al., 1971; PEREIRA; MACHADO, 1987; URCHEI et al., 2000).

QUADRO 1: MÉDIAS DOS GENÓTIPOS PARA OS PARÂMETROS: ALTURA ATÉ A FOLHA + 1, MASSA SECA DA PARTE AÉREA, MASSA SECA DE RAIZ E DIÂMETRO DE COLMO.

Genótipo	Altura		MSPA		MSR		Diâmetro	
	0,5 mM	5 mM	0,5 mM	5 mM	0,5 mM	5 mM	0,5 mM	5 mM
PRBIO-26	9,6 aA	9,7 aA	0,02 bB	0,8 aA	3,4 bA	5,6 aA	5,7 bB	8,3 bA
PRBIO-40	6,5 bA	7, 1 cA	0,17 bA	0,3 bA	2,7 bA	3,3 bA	5,8 bA	5,1 cA
PRBIO-53	6,1 bB	10,5 bA	0,008 bB	0,9 aA	2,9 bB	3,5 bA	5,5 bB	8,2 bA
PRBIO-54	4,3 cB	7,1 cA	-0,17 bB	0,4 bA	3,5 bA	5,2 aA	6,1 bA	7,3 cA
PRBIO-60	7,9 aB	10,6 aA	0,40 aB	1,2 aA	3,1 bB	6,9 aA	7,6 aA	9,2 bA
PRBIO-64	8,3 aB	10,7 aA	0,57 aA	1,0 aA	4,6 aA	5,4 aA	7,1 aB	9,0 bA
PRBIO-86	8,0 aB	10,9 aA	0,83 aB	1,4 aA	3,2 bA	3,9 bA	8,3 aB	10,7 aA
PRBIO-87	6,8 bB	9,5 aA	0,76 aB	1,4 aA	5,4 aA	5,7 aA	7,9 aB	10,6 bA
PRBIO-101	7,1 bB	11,1 aA	0,40 aB	1,1 aA	4,8 aA	6,3 aA	7,3 aA	9,1 bA
PRBIO-130	7,1 bB	11,0 aA	0,76 aA	1,2 aA	3,0 bA	4,6 aA	8,1 aA	9,6 bA
PRBIO-134	8,0 aA	8, 2 cA	0,05 bA	-0,05 cA	2,6 bA	1,4 bA	5,7 bA	5,9 cA
PRBIO-136	8,8 aB	11, 0 aA	0,64 aA	1,0 aA	5,8 aA	4,8 aA	6,9 aA	7,4 cA
PRBIO-137	7,7 bA	5,6 cB	0,16 bA	0,28 bA	4,9 aA	1,4 bB	6,4 bA	6,6 cA
PRBIO-172	7,2 bB	9,2 aA	0,59 aB	0,86 bA	3,1 aA	4,2 bA	5,9 bB	6,5 cA
PRBIO-221	7,1 bA	7,8 cA	0,33 aA	-0,04 cA	3,5 bA	2,7 bA	5,8 bA	5,0 cA
PRBIO-231	7,6 aA	8,5 bA	0,56 aA	0,5 bA	2,6 bA	2,9 bA	7,0 aA	5,7 cA
RB867515	7,2 bA	8,1 bA	0,03 bB	0,6 bA	1,6 bA	2,8 aA	4,7 bA	6,0 cA
SP81-3250	8,5 aB	11,2 aA	0,44 aB	1,3 aA	5,5 aA	5,4 aA	7,9 aB	10,3 aA

Médias seguidas da mesma letra minúscula na vertical e médias seguidas da mesma letra maiúscula na horizontal para cada parâmetro, não diferem significativamente entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de probabilidade. CV: Coeficiente de variação.

Fonte: O autor (2020).

4.4 CONCLUSÃO

Os genótipos de cana energia e cana-de-açúcar apresentaram maior crescimento vegetal na maior concentração de nitrogênio.

O genótipo PRBIO-137 nos parâmetros altura e MSR foi o único genótipo a apresentar maior resultado na concentração baixa de nitrato de amônio.

O genótipo PRBIO-172 foi selecionado como contrastante ao genótipo PRBIO-137 por ter apresentado crescimento vegetativo com a adição de nitrato, nos parâmetros, altura, MSPA e diâmetro, os quais PRBIO-137 obteve medias iguais nas duas concentrações de nitrogênio.

O genótipo RB867515 foi selecionado por ter apresentado resultados similares ao genótipo PRBIO-172.

5 REFERÊNCIAS

BOLOGNA-CAMPBELL, I.R. **Balanco de nitrogênio e enxofre no sistema solo-cana-de-açúcar no ciclo de cana-planta**. 110p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.

BORGES, B. M.; TEIXEIRA L.; MODESTO, V. C.; DE MELLO, R. M.; SILVA, E. S.; BRAOS, B. B. **Métodos de determinação da matéria seca e dos teores de macronutrientes em folhas de alface**. Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas V. 5, N. 1, p. 14, 2011.

DAROS, E.; ZAMBON, C. J. L.; OLIVEIRA, A. R. **Programa de melhoramento da cana-de-açúcar da UFPR: 25 anos de pesquisa**. 1 ed- Curitiba: Graciosa, p. 252, 2016.

FEDENKO, J.R.J. E.; ERICKSON, K.R.; WOODARD, L.E.; SOLLENBERGER, J.M.; VENDRAMINI, R.A.; GILBERT. **Biomass production and composition of perennial grasses grown for bioenergy in a subtropical climate across Florida, USA**. BioEnergy Res. 2013.

FELIPE, M. G. A. **Em Bioetanol de Cana-de-Açúcar: P&D para Produtividade Sustentabilidade**; Cortez, L. A. B., ed.; Edgard Blücher Ltda: São Paulo, 2010, cap. 3 parte 4, 2010.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). R package version 1.2.0.** <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>. 2018.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; PENATTI, C. P. **Crescimento e acúmulo de nitrogênio em cana-planta cultivada em solo coberto com palhada.** Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1347-1354, 2001.

HIMMEL, M. E.; DING, S. Y.; JOHNSON, D. K.; ADNEY, W. S.; NIMLOS, M. R.; BRADY, J. W. **Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production.** Science. v.315, n. 804, 2007.

JUNIOR, A. B. A.; NASCIMENTO, C. W. A.; SOBRAL, M. F.; SILVA, F. B. V.; GOMES, W. A. **Fertilidade do solo e absorção de nutrientes em cana-de-açúcar fertilizada com torta de filtro.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. V. 15, n.10, p. 1004-1013, 2011.

LIU, K. H.; TSAY, Y. F. **Switching between the two action modes of the dual affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation.** EMBO Journal, v. 22, p.1005–1013, 2015.

MAGALHÃES, A. C. N. Fotossíntese. In: FERRI, M. G. (Ed). **Fisiologia vegetal.** São Paulo: Edusp, 1979. v.1, p.117-167.

MAGALHÃES, A. C. N. **Análise quantitativa do crescimento.** In: FERRI, M. G. Fisiologia vegetal. São Paulo, EPU, v.1, p.363 – 50, 1985.

OLIVIERA, A. K. M.; GUALTIERI, S. C. J. **Crescimento inicial de *Tabeluia aurea* sob três intensidades luminosas.** RESVBAU, v. 6, n. 2, p. 90-103, 2011.

OLIVEIRA, A.; SOUZA, A. R.; CLEMENTE, J. M.; DOS SANTOS T. M.; DUARTE, A. R.; MACHADO, M, G. **Crescimento Vegetativo De Variedades De Cana-De-Açúcar**. Humanidades & Tecnologia Em Revista (Finom) - ISSN: 1809-1628, v. 18, 2019.

PEIXOTO, C. P.; CRUZ, T. V.; PEIXOTO, M. F. S. P. **Análise quantitativa do crescimento de plantas: Conceitos e práticas**. Enciclopédia Biosfera, v. 7, n. 13 2011.

O'BRIEN, D., AND J. SUSZKIW. **Finding the right biofuels for the southeast: A range of alternatives**. Agric. Res. v. 60, n.10, 2012.

RICHARD, E., JR., T. TEW, R. COBILL, AND A. HALE. **Sugar/ energy canes as feedstocks for the biofuels industry**. In: Proceedings of the Short Rotation Crops International Conference, Bloomington, MN. 19–21 Aug. 2008. USDA For. Serv., Northern Res. Stn. 47, Newton Square, PA. p. 47. 2008.

SANTOS, C.J.L.; MENEZES, J.F.S.; GONÇALVES JÚNIOR. D.; GONÇALVES, M.E.M.P.; SILVA, T.R. **produção de massa seca da parte aérea e de raízes da soja adubada com dejetos líquidos de suínos**. IN: Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos de Animais Uso dos Resíduos da Produção Animal como Fertilizante 11 a 13 de Março de 2009 – Florianópolis, SC – Brasil, 2009.

SARRUGE, J.R. **Soluções nutritivas**. Summa Phytopathologica, Jaboticabal, v.1, n.3, p.231-233, 1975.

SHIELDS, S.; BOOPATHY, R. **Ethanol production from lignocellulosic biomass of energy cana**. International Biodeterioration and Biodegradation. V. 65, p. 142-146, 2011.

STONE, P. J.; SORENSEN, I. B.; JAMIESON, P. D. Effect of soil temperature on phenology, canopy development, biomass and yield of maize in a cool-temperature climate. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 48, p. 169-178, 1999.

SUGUITANI, C., MATSUOKA, S. **Efeitos do fosforo nas características industriais e na produtividade agrícola em cana-de-açúcar (cana-planta) cultivada em duas regiões do estado de São Paulo.** Revista Ciência do Solo, p. 119, 2001.

VALSECHI, O. A. **Pagamento de cana pelo teor de sacarose: O sistema implantado em São Paulo.** Brasil Açucareiro, v.101, n.1/3, p.32-39, 1983.

6 PARAMÊTROS AGRÔNOMICOS E EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITRATO NRT1.1 E NRT2.1 NOS GENÓTIPOS PRBIO-137, PRBIO-172 E RB867515

RESUMO

A identificação de genes associados a absorção e transporte de nitrogênio é o primeiro passo para o desenvolvimento de plantas mais eficientes na utilização de fertilizantes e/ou para a otimização da adubação nitrogenada. Além disso, por meio do conhecimento atrelado a esses genes, pode haver diminuição de custos de produção e impactos ambientais causados pelo nitrogênio. Sabe-se que o nitrogênio desempenha papel metabólico, fisiológico e estrutural em plantas e possui destaque na cana-de-açúcar, por ser limitador no desenvolvimento fenológico e produtividade da cultura. Deste modo, o trabalho teve por objetivo a análise de parâmetros agrônômicos e expressão gênica de genes NRT1.1 e NRT2.1, relacionados a proteínas transportadoras de nitrato em genótipos de cana energia e cana-de-açúcar. Foram usados genótipos de cana energia (PRBIO-137 e PRBIO-172) e o genótipo de cana-de-açúcar RB867515 para duas concentrações de nitrato de amônio. A condução do experimento foi feita em casa de vegetação no período de 90 dias. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com 3 genótipos, sendo 2 de cana energia e 1 de cana-de-açúcar em esquema fatorial 3 x 2 (3 genótipos x 2 doses de nitrato) com dez repetições por tratamento. Foram avaliados: altura até folha +1, diâmetro do colmo, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR), volume e comprimento de raízes e medição do teor de clorofila com medidor SPAD. Em seguida foi realizado a análise de expressão gênica utilizando a técnica de RT-PCR. Por meio dos parâmetros agrônômicos, foi obtido que PRBIO-137 foi o genótipo com maiores resultados para altura, massa seca de raiz e teor de clorofila, demonstrando melhor assimilação de nitrogênio. Para análise de expressão gênica, foi observado que houve maior expressão dos genes NRT1.1 e NRT2.1 para os três genótipos na maior concentração de nitrato de amônio. A mudança da concentração de nitrogênio acarreta em um maior nível de expressão gênica de transportadores de nitrato NRT1.1 e NRT2.1.

Palavras-chave: RT-PCR; *Saccharum spp*; Genótipos; Nitrogênio.

GENE EXPRESSION OF NRT1.1 AND NRT2.1 NITRATE TRANSPORTERS IN THE PRBO-137, PRBIO-172 AND RB867515 GENOTYPES

ABSTRACT

The gene expression of nitrogen uptake and transport is the first step towards the development of better fertilizer efficiency in plants. In addition to that, it can reflect in production costs and environmental impacts caused by nitrogen. It is well known that nitrogen plays a metabolic, physiological and structural role in plants and is important in sugarcane because it is taken as a limiter in phenological development and crop productivity. In this way, the aim of this work was to analyze plant growth and gene expression of NRT1.1 and NRT2.1 genes in energy cane and sugarcane genotypes. The genotypes used were PRBIO-137, PRBIO-172 and RB867515 in two concentrations of ammonium nitrate, low (0.5 mM) and high (5 mM). The experiment was carried out in a greenhouse over a period of 90 days. The experimental design was completely randomized with three genotypes, two of energy cane and one of sugarcane in a factorial scheme 3 x 2 (three genotypes x two concentration of nitrate) with ten replicates by treatment. The following parameters used evaluated: height at leaf +1, culm diameter, leaves dry matter, root dry matter, root volume, root length and measurement of chlorophyll content with a SPAD meter. The gene expression analysis was performed using the RT-PCR technique. The results showed the genotype PRBIO-137 was considered with better growth in height, root dry matter and chlorophyll content. These can demonstrate better nitrogen assimilation. Also, it was observed that there was higher gene expression, and consequently, better nitrogen uptake, for the two genes and in the three genotypes at the highest concentration of ammonium nitrate. The change in nitrogen concentration results in a higher level of gene expression of NRT1.1 and NRT2.1 nitrate transporters.

Keywords: RT-PCR; *Saccharum spp*; Genotypes; Nitrogen.

6.1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio é constituinte de moléculas como proteínas, enzimas, coenzimas, ácidos nucléicos e clorofila. Está relacionado a processos fisiológicos de grande importância para a sobrevivência e homeostase de plantas. (MIFLIN; LEA, 1976; TRIVELIN et al., 2002b; KRAPP, 2015).

No solo são encontradas duas formas inorgânicas de nitrogênio, o amônio (NH_4) e nitrato (NO_3), sendo esses provindos da matéria orgânica ou do uso de fertilizantes nitrogenados (ARAKI; HASEGAWA, 2006).

A cana-de-açúcar possui maior afinidade pelas formas mineralizadas do nitrogênio, sendo que entre as duas formas, o nitrato tem maior assimilação pela planta (JIN et al., 2015).

O nitrogênio, quando integrado ao solo, sofre diferentes transformações químicas e microbiológicas, as quais podem resultar em perdas de nutriente, o que culmina na diminuição de produtividade vegetal (FRANCO et al., 2011).

O aproveitamento do nitrogênio pela cana-de-açúcar é de 40% aproximado, tornando fundamental o desenvolvimento de técnicas de manejo adequados de adubação como forma de evitar prejuízos (VALE et al., 2013).

A dinâmica do nitrogênio no ambiente é o principal desafio para a otimização de seu uso na cana-de-açúcar. Com isso, busca-se melhorar a resposta do nutriente nas variedades comerciais por meio de genótipos mais eficientes no uso do nutriente. Esse desafio nasce da demanda de se diminuir os altos custos dos fertilizantes nitrogenados para a cadeia produtiva da cana-de-açúcar no Brasil (DAROS et al., 2016).

Após a absorção via raízes, há um processo celular de assimilação do nitrogênio. Esse processo, ocorre com a redução do nitrato para amônio, pela atuação das enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR) até ser absorvido como aminoácidos pela atuação de enzimas glutamato sintase (GOGAT) e glutamina sintase (GS) (TSAY et al., 2007; VITAL; GUTIERREZ, 2008).

A absorção do nitrato é efetuada por proteínas transportadoras, localizadas na membrana plasmática. Esses genes de transportadores são reconhecidos e estudados a mais de 20 anos para elucidar qual o caminho da absorção do nitrogênio em plantas, e assim, compreender o metabolismo vegetal (MAATHIUS, 2009).

A absorção do nitrato é feita pela família de genes NRT (*Nitrate Transporters*). Esses genes possuem a capacidade de absorver o nitrato em baixa e alta concentração no solo, além de possuírem diversas isoformas em diferentes espécies vegetais (ARAKI; HASEGAWA, 2006; FERNANDES; SOUZA, 2006).

Desde modo, o objetivo do trabalho foi de realizar a análise de parâmetros agronômicos e expressão gênica de genes NRT1.1 e NRT2.1, relacionados a proteínas transportadoras de nitrato em genótipos de cana energia e cana-de-açúcar.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 PARÂMETROS AGRONÔMICOS DOS GENÓTIPOS PRBIO-137, PRBIO-172 E RB867515.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (latitude -25.410382 e longitude 49.249242 S) com altitude média de 934 m.

Foram utilizados para a realização do projeto, toletes de 3 genótipos de cana-de-açúcar, provenientes do Programa de melhoramento de cana-de-açúcar- UFPR, localizado em Paranaíba-PR. Os toletes, com uma gema axilar viável, sem necrose ou oxidação, foram acondicionados para germinação a 36°C e alta umidade por 3-5 dias, em Curitiba- Pr.

Após a germinação do material, os toletes foram transferidos para vasos de 5 litros, com areia e vermiculita de granulometria fina na proporção de 1:1, sendo esse um substrato pobre em nutrientes, pelo período total de 90 dias.

Dentro dos 90 dias de experimento, os 30 primeiros dias, serviram para esgotamento de reservas endógenas dos toletes, sendo adicionado 350 ml de água deionizada conforme necessidade das plantas para evitar estresse hídrico. Nos 60 dias restantes, foi feito uso dos tratamentos com solução nutritiva, proposta por Sarruge (1975), com modificações, nas doses de 0,5 mM e 5 mM de nitrogênio na forma de nitrato de amônio.

A condução do experimento seguiu o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 3 x 2 com dez repetições por genótipo. Utilizaram-se 2 genótipos de cana energia e 1 de cana-de-açúcar convencional.

Os parâmetros avaliados foram: altura folha +1, massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR) e diâmetro do colmo. A medição de altura foi feita por meio de régua milimétrica a partir do solo até a inserção da folha +1. O diâmetro do colmo foi realizado com o uso de um paquímetro digital, na altura de 5 cm do solo. As massas secas tanto da parte aérea quanto raízes foram realizadas com o uso de balança de precisão, sendo realizada secagem prévia a 65°C em estufa, para então realizar a pesagem.

Além disso, foram avaliados os parâmetros: índices de clorofila na folha +3, utilizando equipamento SPAD-502 da Konica Minolta® na região média das folhas, semanalmente. Antes do material ser secado para pesagem, foi feita a identificação e manutenção das raízes em potes com álcool 70%, para análise de morfologia do sistema radicular com o uso do equipamento WinRHIZO Pro 2007^a (Règent Instr. Inc.), acoplado ao scanner profissional Epson XL 10000, equipado com unidade de luz adicional (TPU). A utilização desse equipamento se fez para melhor análise das raízes, objeto foco da absorção dos tratamentos. Desta maneira, foram adicionados os parâmetros de comprimento total e volume das raízes

Após as coletas de dados, esses foram submetidos a testes de normalidade e homogeneidade. Respondendo a esses testes, foram testados a análise de variância pelo teste F a nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o uso do software R e uso do pacote de dados *ExpDes.pt*. Os parâmetros de MSPA e MSR foram transformados com a função BOX-COX para cumprir os pressupostos da anova (FERREIRA et al., 2018; R CORE TEAM, 2019).

6.2.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Decorridos os 90 dias de experimento de crescimento vegetal, o último dia de tratamento com a solução nutritiva ocorreu 24 horas antes da coleta das raízes. Para que não ocorresse a degradação do RNA e contaminação, todo o processo foi feito com uso de luvas de plástico e as amostras condicionadas em nitrogênio líquido (N₂). O alvo da coleta foram as pontas das raízes jovens, em torno de 3 cm de comprimento, coletadas de pelo menos três raízes jovem e não adventícias. As amostras foram devidamente identificadas, mantidas em papel alumínio e armazenadas em freezer na temperatura de - 80°C.

O RNA total foi extraído das amostras com o uso do reagente de Trizol. Em torno de 0,1 g (correspondendo a 3 pontas de raízes) foram maceradas usando N₂ líquido e homogeneizadas em 1 ml de reagente Trizol, seguido de breve agitação em vórtex. O material seguiu em incubação a 65°C por 10 minutos. Após esse processo, ocorreu incubação por 5 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 200 µl de clorofórmio e a solução misturada por 15 segundos. As amostras foram mantidas mais uma vez a temperatura ambiente por 2-3 minutos e centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm. Após esse período, três fases distintas foram geradas na mistura: a fase aquosa menos densa, contendo RNA; fase intermediária ou interfase contendo DNA e fase orgânica mais densa contendo as proteínas celulares. Cada fase pôde ser isolada, assim como o conteúdo de cada uma destas, com a utilização de protocolos específicos.

O protocolo seguiu com a transferência de 400 µl da fase superior líquida para um novo eppendorf. Adicionou-se 500 µl de isopropanol, seguidos de inversões e incubação a temperatura ambiente por 10 minutos. Esse novo tubo foi centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos. Por fim, o líquido foi descartado, havendo a manutenção do pellet. O pellet foi lavado com 1 ml de álcool 70% seguido de centrifugações a 13000 rpm por 5 minutos.

As amostras foram secas em bomba a vácuo por 15 minutos e ressuspensas em 20 µl de H₂O D.E.P.C (dietil pirocarbonato). A qualidade do RNA extraído foi verificada com o uso de NANODrop por meio dos valores de absorbância nas relações A260/A230 e A260/A280.

6.2.3 RESSUSPENSÃO DO RNA

A ressuspensão do RNA é parte do processo para conversão do RNA em cDNA. Para isso foi adicionado 5 µl de Tampão DNase ao eppendorf contendo RNA extraído, seguido de 1 µl de DNase turbo. Após essas etapas, as amostras foram mantidas a 37°C por 30 minutos.

6.2.4 INATIVAÇÃO DA DNASE

O processo de inativação da DNase consistiu na precipitação com acetato de sódio. Foram adicionadas às amostras 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M com

pH 5,0 e 3 volumes de etanol 100%. As amostras foram incubadas por no mínimo 1 hora ou *overnight* a -20°C . Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14500 rpm. Foram realizadas duas lavagens com etanol 70%, seguida de secagem a vácuo por 15 minutos e ressuspensão em 20 μl de H₂O D.E.P.C. (diethylpyrocarbonate).

6.2.5 CONVERSÃO EM cDNA

A conversão em cDNA, as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A fita simples de cDNA foi sintetizada utilizando a “TaqMan Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems) e primer oligodT de acordo com as recomendações do fabricante. Depois de tratadas com DNase e feita a aferência da quantidade de cDNA em NANODrop, foram diluídas à concentração de material gênico de 500 ng. μl .

O volume total para o processo consistiu em 10 μl do mix e 10 μl da amostra a ser sintetizadas. Para o controle negativo foi utilizando um *pool* com todas as amostras as quais também foram diluídas para 500 ng μl^{-1} e compuseram uma amostra com 10 μl do *pool* e 10 μl do mix, esse sem conter Multiscribe RT.

Em seguida foi utilizada a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A condição do termociclador para realização do procedimento foi o seguinte: 10 minutos a 25°C , 120 minutos a 37°C , 5 minutos a 85°C e da síntese de cDNA foi feita para 40 ciclos. Ao final do processo de 40 reações o a temperatura da reação se manteve a 4°C . A qualidade do cDNA extraído foi verificada com o uso de NANODrop por meio das relações A260/A230 e A260/A280.

6.2.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITROGÊNIO

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas em triplicata, utilizando o kit “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: 95°C por dez minutos 60°C por trinta segundos e finalmente a curva de dissociação com aumento de temperatura de $0,3^{\circ}\text{C}$ de 60°C até 95°C para verificar a

especificidade da reação. Ao final da reação a temperatura manteve-se em 4°C. Ademais, o gene Gliceraldeído- 3 fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como controle endógeno. A qualidade do RNA extraído foi verificada com o uso de NANOdrops por meio das relações A260/A230 e A260/A280.

Foram utilizados primers do gene endógeno: GAPDH (*Forward*: 5'-CACGGCCACTGGAAGCA -3' e *reverse*: 5'- TCCTCAGGGTTCCTGATGCC -3') e dos genes alvos: NRT1.1 (*forward*: 5'- GCGACCACCATCATGTTCTG -3' e *reverse*: 5'- CACGGTGAGGAGGATGGAG -3') e NRT2.1 (*forward*: 5'- GGAGAACCTGGGCCTGAC -3' e *reverse*: 5'- GCCAGGAGAAAGCCGATGA -3') todos desenhados previamente pelo grupo de pesquisa para averiguar a presença de genes codificantes para proteínas transportadores de nitrogênio nos genótipos de cana energia e cana-de-açúcar.

Os cálculos para análise de expressão gênica foram feitos a partir dos valores de Ct (ciclo do *threshold*) obtidos para cada reação de RT-PCR. Obteve-se as médias de Ct para os genes alvos e do gene de referência (GAPDH) que serviu para normalizar os dados. Em seguida, foi realizada a normalização dos dados dos genes alvos pelo gene de referência, calculando-se o ΔCt de todos os valores obtidos ($\Delta Ct = Ct \text{ alvo} - Ct \text{ referência}$) (TABELA 2).

Uma vez obtido os ΔCt 's, os valores relativos de expressão gênica foram realizados pela fórmula matemática de $2^{-\Delta Ct}$:

$$2^{-((Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene referência}) - (m\acute{e}dia \text{ Ct } 5 \text{ mM gene alvo} - m\acute{e}dia \text{ Ct } 5 \text{ mM gene referência}))}$$

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos apresentaram diferenças significativas de acordo com o teste F da análise de variância (ANOVA) ao nível de 5 % de probabilidade quando avaliados os parâmetros agrônômicos de altura até a folha +1, massa seca de raiz, diâmetro e índice de teor de clorofila.

Pode-se observar diferenças estatísticas entre os genótipos estudados. Porém, quando analisado a influência das doses de nitrogênio nos parâmetros, foi verificado que não houve significância estatística em nenhum parâmetro avaliado (TABELA 3).

TABELA 3: ANÁLISE DE VARIÂNCIA DE GENÓTIPOS PRBIO-137, PRBIO-172 E RB867515 SUBMETIDOS AS DOSES DE 0,5 mM E 5 mM DE NITRATO DE AMÔNIO.

Fonte de variação	GL	Altura	MSPA	MSR	VOL RAIZ	COMP RAIZ	Diâmetro	Clorofila
		Cm	g	g	cm ²	cm ³	Mm	Unidades
Genótipos	2	16,77*	0,08ns	0,08*	0,15 ns	182,86 ns	5,01*	530,21*
Doses N	1	2,06 ns	0,02 ns	0,02 ns	0,004 ns	389,55 ns	0,001 ns	144,93
Genótipos x Dose N	2	1,74 ns	0,03 ns	0,04 ns	0,06 ns	73,64 ns	0,67 ns	60,04
Resíduo	54	4,40	0,05	0,17	0,12	50,15	0,77	56,31
Coefficiente de Variação (%)		18,17	31,29	60,03	14,8	14,63	13,48	16,9

Legenda: ns: não significativo a 5%; *: significativo a 5%; **: significativo a 1%.

Fonte: O autor (2020).

Foi utilizado o período de tempo de 90 dias de crescimento vegetal para avaliar os parâmetros agronômicos. Essa delimitação de período, corresponde ao intervalo de tempo dos estádios de brotação (20-30 dias) e de perfilhamento (40-120 dias) em cana-de-açúcar (DIOLA; SANTOS, 2010). Esse período de crescimento inicial é uma análise primária de produção, sem a necessidade de equipamentos sofisticados que confere em conhecer a ecologia fisiologia da planta (KVET et al., 1971; PEREIRA; MACHADO, 1987; URCHEI et al., 2000).

Na análise do fator genótipos no parâmetro altura, foi observado que o genótipo PRBIO-137 obteve o maior resultado e apresentou diferença estatística em comparação ao genótipo PRBIO-172, mas com média estatística igual ao genótipo RB867515 (TABELA 4).

Para o índice de teor de clorofila, o genótipo PRBIO-137 apresentou maiores médias (50,32 unidades) quando comparado aos genótipos PRBIO-172 (40,96 unidades) e RB867515 (41,96 unidades) (TABELA 4).

Essa medição do teor de clorofila, está relacionado a fotossíntese e, portanto, conversão luminosa em química. A fotossíntese é uma função metabólica relacionada a produção de biomassa, adaptabilidade ao meio e importante para o crescimento vegetal (JESUS; MARENCO, 2008).

Além disso, o uso do clorofilômetro SPAD é capaz de estimar o conteúdo de nitrogênio em plantas sem fazer a destruição do material. É um método alternativo e rápido que estima concentração de clorofila relativa emitida pela intensidade da cor verde das folhas (JIFON et al., 2005; MARTINS et al., 2010; SILVA et al., 2014).

Em paralelo a produção de biomassa, em cana-de-açúcar, a medição de teores de clorofila serve também para avaliar o estresse hídrico de diferentes variedades comerciais, servindo como modo de seleção de genótipos para tolerância de estresse hídrico (SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2014)

A respeito dos resultados de leitura do clorofilometro, Torres Netto e colaboradores (2005) afirmam que ocorre deficiência de clorofila a partir do momento que as medições são inferiores a 40 unidades, afetando assim a fotossíntese e o metabolismo vegetal. Para tanto, os três genótipos apresentaram resultados acima das 40 unidades, sendo um indicativo de bom estado nutricional e absorção de nitrogênio.

Na sequência das análises, os parâmetros MSPA, volume de raízes e comprimento de raízes não apresentaram diferença estatística entre os genótipos estudados.

O parâmetro MSR o genótipo RB867515 obteve o menor resultado entre os três genótipos avaliados. Enquanto que os genótipos de cana energia apresentaram resultados estatisticamente iguais para o parâmetro (TABELA 4).

Parâmetros como comprimento total e volume de raízes, são de interesse para pesquisas científicas por se relacionam ao bom desenvolvimento do sistema radicular. Esse sistema radicular quando bem desenvolvido, otimiza o uso de recursos hídricos e minerais podendo predizer produtividade de uma cultura (FANTE et al., 1994).

Já os parâmetros de altura, MSPA, MSR e diâmetro de colmo, estão relacionados a análise de crescimento vegetal em cana-de-açúcar e outras espécies

de plantas. Sendo relacionados a ganhos de produtividade (VASECHI, 1983; BOLOGNA-CAMPBELL, 2007, OLIVEIRA et al., 2019).

TABELA 4: MÉDIAS DO DESEMPENHO DE TRÊS GENÓTIPOS SUBMETIDOS A DUAS DOSES DE NITRATO DE AMÔNIO (0,5 mM E 5 mM).

Genótipos	Altura	MSR	Diâmetro	Clorofila
	Cm	G	Mm	Unidades
PRBIO-172	10,72 b	0,68 ab	6,46 a	40,96 b
PRBIO-137	12,53 a	0,90 a	6,06 ab	50,32 a
RB867515	11,41 ab	0,50 b	7,06 a	41,96 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: O autor (2020).

A respeito dos resultados de expressão gênica, sabe-se que a absorção de nitrato por meio das proteínas de transporte de nitrogênio configura o primeiro passo na aquisição de nitrogênio pelas plantas (DECHORGNAT et al., 2011).

Considerando a importância dessas proteínas, foi observado no presente trabalho que em ambos os genes estudados, NRT1.1 e NRT2.2, a resposta de expressão gênica foi maior na dose mais alta de nitrato de amônio (FIGURAS 1).

É de conhecimento que a absorção de nitrato feita pelos transportadores NRT é feita em concentrações altas de baixas (ARAKI; HASEGAWA, 2006; FERNANDES; SOUZA, 2006). Corroborando com o obtido no presente trabalho. Essa característica proporciona a planta maiores chance de absorção do nutriente.

Além disso, a família gênica NRT2, que comporta o gene NRT2.1, possui maior afinidade pela de absorção de nitrato em doses altas (GUOWEI, et al., 2016). Demonstrando assim que os três genótipos estudados seguiram resposta similar para o gene.

Ao observar a resposta de expressão gênica de NRT1.1 entre os dois genótipos de cana energia, foi observado que PRBIO-137 obteve os maiores resultados de expressão na concentração de 0,5 mM e expressão uniforme na dose de 5 mM (FIGURA 1a).

O genótipo RB867515 apresentou resposta de expressão do gene NRT1.1 uniforme para as duas concentrações de nitrogênio quando comparado aos genótipos de cana energia (FIGURA 1a).

A resposta de expressão gênica de NRT2.1 entre os dois genótipos de cana energia foi uniforme para as duas concentrações. Enquanto que o genótipo RB867515 apresentou resposta uniforme para concentração de 5 mM e resposta superior aos genótipos de cana energia na concentração de 0,5 mM (FIGURA 2b).

Fan e colaboradores (2017) apontam que os genes responsáveis pela absorção de nitrogênio são descritos e caracterizados a mais de 20 anos e a identificação desses genes em diferentes plantas possibilita entender potenciais abordagens de manejo de adubação. Além de promover melhores estratégias para produtividade vegetal e o uso eficiente do nitrogênio.

Além da absorção de nitrogênio, os transportadores apresentam funções no metabolismo de plantas. A exemplo disso, estudos em *Arabidopsis*, planta modelo para sequenciamento e expressão gênica de transportadores de nitrogênio, apontam que o gene NRT1.1 está relacionado ao enraizamento adventício (TSAY et al., 1993; LIU et al., 1999; LIU; TSAY, 2007).

Ressalta-se também que NRT1.1 serve como sensor a presença de nitrato, e desta forma funciona como regulador da expressão gênica de outros genes de transportadores de nitrogênio, com destaque ao gene NRT2.1 (HO et al., 2009).

Esses genes também são moléculas sinalizadoras que modulam a síntese de citocininas, que por sua vez controla processos de desenvolvimento, síntese de proteínas e aquisição de outros macros e micronutrientes, além de translocação de auxina (HIROSE et al., 2008; KROUK et al., 2014).

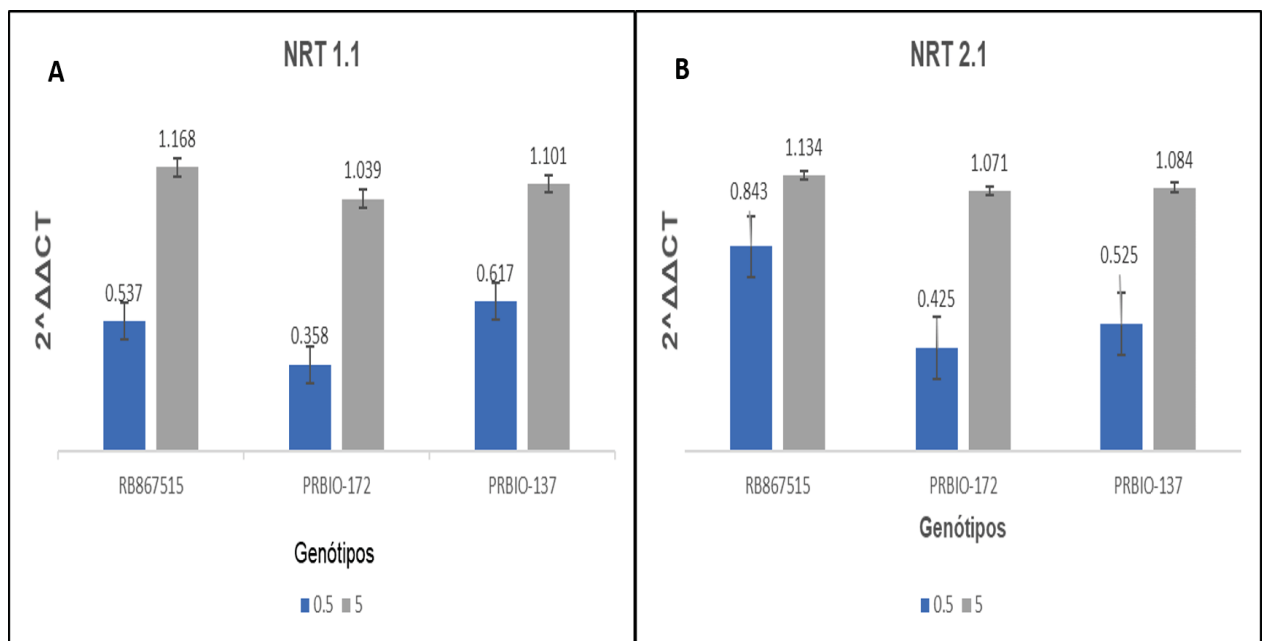
Sabe-se também que em período prolongado, a presença do nitrato como fonte nutritiva afeta do desenvolvimento e arquitetura radicular, a abertura e fechamento de estômatos e o transporte de fitormônios (WILKINSON et al., 2007, MEDICI; KROUK, 2014), podendo assim explicar a não presença de diferença estatística nos parâmetros comprimento de raízes e volume de raízes.

A respeito da família NRT2, essa família também é encontrada em plantas de *Arabidopsis* e arroz. Entretanto, há relatos da necessidade de interação com outra família de proteínas transportadoras de nitrato, a subfamília NAR (*nitrate assimilation related protein*) para que ocorra assimilação do nitrato (FENG et al., 2007)

Vale ressaltar que estudos em *Arabidopsis* mostram que os genes NRT2.1 e NRT2.2 são responsáveis por em torno de até 80% do transporte de nitrato quando em concentrações micromolares (LIU et al., 2007). Isso demonstra a importância do conhecimento da expressão gênica dessas proteínas de assimilação de nitrogênio. Com isso, o resultado mais expressivo para o gene NRT2.1 pode ser explicado (FIGURA 1b).

Por meio dos resultados obtidos, é possível afirmar que há diferença na resposta de expressão gênica nos três genótipos estudados dentro das duas doses de nitrato de amônio. Porém, foi observado que houve grande desvio padrão nos dois genes para a dose de baixa concentração de nitrato, o que dificulta na comparação entre genótipos para a concentração de 0,5 mM de nitrato de amônio (FIGURA 1).

FIGURA 1: MÉDIAS DA EXPRESSÃO GÊNICA DO GENE NRT 1.1 E NRT2.1 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) SUBMETIDOS A NITRATO DE AMÔNIO NAS DOSES 0,5 mM E 5 mM.



Fonte: O autor (2020).

Os genes das famílias NRT1 e NRT2 foram escolhidos por consistirem na maior parte dos genes que fazem parte da família NRT de proteínas transportadoras de nitrato. Deste modo, ressalta-se a importância de mensurar a expressão gênica desses genes em plantas de importância econômica como cana-de-açúcar (TSAY et al., 2007).

Whang e colaboradores (2019) realizaram em cana-de-açúcar a identificação de famílias gênicas de proteínas transportadoras de nitrato por meio do uso do genoma de *Saccharum spontaneum* L. Esse estudo proporcionou conhecer o padrão de expressão gênica de proteínas transportadoras de nitrogênio e em especial as famílias genicas NRT1 e NRT2, enquanto que o presente trabalho utilizou a informação da identificação e quantificou genes.

6.4 CONCLUSÃO

A mudança da concentração de nitrogênio acarreta em um maior nível de expressão gênica de transportadores de nitrato NRT1.1 e NRT2.1.

A resposta de expressão gênica de NRT1.1 entre os dois genótipos de cana energia obteve PRBIO-137 com maior resultado de expressão gênica na concentração de 0,5 mM e expressão uniforme na dose de 5 mM

A resposta de expressão gênica de NRT2.1 entre os dois genótipos de cana energia foi uniforme para as duas concentrações.

6 CONCLUSÕES FINAIS

A concentração de nitrogênio influencia parâmetros agronômicos de altura, MSPA, MSR, diâmetro de colmo e teor de clorofila em genótipos de cana energia e cana-de-açúcar.

PRBIO-137 foi o único genótipo a apresentar melhores resultados na avaliação de parâmetros agronômicos na menor concentração de nitrogênio.

A expressão gênica de NRT1.1 e NRT2.1 foi maior na concentração mais alta de nitrato de amônio.

8 REFERÊNCIAS

ARAKI, R. & HASEGAWA, H. **Expression of Rice (*Oryza sativa* L.) Genes Involved in High- Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction.** *Breeding Science*, v. 56, p. 295-302, 2006.

BOLOGNA-CAMPBELL, I.R. **Balanco de nitrogênio e enxofre no sistema solo-cana-de-açúcar no ciclo de cana-planta.** 110p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.2007.

DAROS, E.; ZAMBON, C. J. L.; OLIVEIRA, A. R. **Programa de melhoramento da cana-de-açúcar da UFPR: 25 anos de pesquisa.** 1 ed- Curitiba: Graciosa, p. 252, 2016.

DECHORGNAT J.; NGUYEN C. T.; ARMENGAUD P.; JOSSIER M., DIATLOFF E.; FILLEUR S. **From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants.** *Jornal Exp. Bot.* v. 62, p. 1349–1359, 2011.

DIOLA, V.; SANTOS, F. **Fisiologia.** In: **SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e álcool: tecnologias e perspectivas.** Viçosa: Editora UFV. p. 25-49, 2010.

FAN, X.; NAZ, M.; FAN, X.; XUAN, W.; MILLER, A. J.; XU, G. **Plant nitrate transporters: from gene function to application,** *Journal of Experimental Botany*, Volume 68, Issue 10, 1 May 2017, p. 2463–2475, 2017.

FANTE IÚNIOR, L.; REICHARDT, K.; RODRIGUES, IA; JORGE, L.Ade C.; BASSOI, L.H.; OLIVE~ I.C.M.de: CREST ANA, s.; BACCHI, O.O.S.; GODOY, R.; PILOTTO, I.E. **Relações entre metodologias para avaliação de raízes e da densidade do solo.** In: congresso latino americano de ciência do solo, 13., reuniao brasileira de biologia do solo, i, simpósio brasileiro sobre microbiologia do solo, 4., reunião, brasileira sobre micorrizas, 6., reunião brasileira de manejo e conservação do solo e da água, 11, 1996.

FENG S, MARTINEZ C, GUSMAROLI G, WANG Y, ZHOU J, WANG F, CHEN L, YU L, IGLESIAS-PEDRAZ JM, KIRCHER S. **Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins**. Nature 451: 475–479, 2008.

FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. **Absorção de nutrientes**. In: FERNANDES M. S. (Org.). Nutrição Mineral de Plantas. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 115-152, 2006.

FERREIRA, E. B.; CAVALCANTI, P. P.; NOGUEIRA, D. A. **ExpDes.pt: Pacote Experimental Designs (Portuguese). R package version 1.2.0**. <https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes.pt>. 2018.

FRANCO, H.C.J.; OTTO, R.; FARONI, C.E.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, E.C.A.; TRIVELIN, P.C.O. **Nitrogen in sugarcane derived from fertilizer under Brazilian field conditions**. Field Crops Research, v. 121, p. 29-41, 2011

GUOWEI LI, PASCAL TILLARD, ALAIN GOJON, CHRISTOPHE MAUREL, **Dual regulation of root hydraulic conductivity and plasma membrane aquaporins by plant nitrate accumulation and high-affinity nitrate transporter NRT2.1**, Plant and Cell Physiology, v. 57, Issue 4, p. 733–742, 2016.

HIROSE et al. **Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation**. J Exp Bot, v. 59 (1) p. 75-83, 2008.

HO, C. H.; LIN, S. H.; HU, H. C.; TSAY, Y. F. **CHL1 functions as a nitrate sensor in plants**. Cell v. 138, p. 1184–1194, 2009.

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

JIN, Z.; ZHU, Y.; LI, X.; DONG, Y, A. N. Z. **Soil N retention and nitrate leaching in three types of dunes in the Mu Us desert of China**. Scientific Reports 5, 14222, 2015.

JIFON, J. L.; SYVERTSEN, J. P.; WHALEY, E. **Growth environment and leaf anatomy affect nondestructive estimates of chlorophyll and nitrogen in citrus sp. leaves.** Journal of the American Society for Horticultural Science, Alexandria, v.130, n.2, p.152-158, 2005.

KVET, J.; ONDOK, J.P.; NECAS, J.; JARVIS, P.G. **Methods of growth analysis.** In: SESTÁK, Z.; CATSKÝ, J.; JARVIS, P.G. (Eds.). Plant photosynthetic production: manual of methods. The Hague: W. Junk. p.343-391, 1971

KRAPP, A. **Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces.** Curr. Opin. Plant Biol. v. 25, p. 115-122, 2015.

KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH A, et al. **Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants.** Developmental Cell 18, 927–937, 2010.

LIU, K. H.; HUANG, C. Y.; TSAY, Y. F. **CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake.** Plant Cell v. 11, p. 865–874, 1999.

LIU et al. **Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 Inducible High-Affinity Nitrate Transporter Gene Cluster.** Plant Physio v. 143 (1) p. 425-433, 2007.

MARTINS AD; COELHO FS; LEAO AB; SILVA MCC; BRAUN H; FONTES PCR. **Relação entre índice SPAD, teores de clorofila extraível e nitrogênio na folha de batata.** Horticultura Brasileira 28: S835-S841, 2010.

MACHADO, E. C.; PEREIRA, A. R.; FAHL, J. I.; ARRUDA, H. V.; CIONE, C. **Índices biométricos de duas variedades de cana-de-açúcar.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 17, n. 9, p. 1323-1329, 1982.

MAATHUIS, F. J. M. **Physiological functions of mineral macronutrients.** Current Opinion in Plant Biology, v. 12, p.250-258, 2009.

MEDIDICI A, KROUK G. **The primary nitrate response: a multifaceted signalling pathway**. Journal of Experimental Botany v. 65, 2014.

MIFLIN, B.J., LEA, P.J. **The pathway of nitrogen assimilation in plants**. Phytochemistry, New York, v.15, p.873-885, 1976.

OLIVEIRA, A.; SOUZA, A. R.; CLEMENTE, J. M.; DOS SANTOS T. M.; DUARTE, A. R.; MACHADO, M, G. **CRESCIMENTO VEGETATIVO DE VARIEDADES DE CANA-DE-AÇÚCAR**. HUMANIDADES & TECNOLOGIA EM REVISTA (FINOM) - ISSN: 1809-1628, v. 18, 2019.

PEREIRA, A.R.; MACHADO, E.C. **Análise quantitativa do crescimento de comunidades vegetais**. Campinas : IAC, p. 33,. (IAC. Boletim Técnico, 114), 1987.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>, 2019.

SARRUGE, J.R. **Soluções nutritivas**. Summa Phytopathologica, Jaboticabal, v.1, n.3, p.231-233, 1975.

SILVA, M. de A.; JIFON, J.L.; SHARMA, V.; SILVA, J.A.G.; CAPUTO, M.M.; DAMAJ, M.B.; GUIMARÃES, E.R.; FERRO, M.I.T. **Use of physiological parameters in screening drought tolerance in sugarcane genotypes**. Sugar Tech, Nova Deli, v. 13, n. 2, p. 178-184, 2011.

SILVA, MARCELO DE ALMEIDA et al. **Pigmentos fotossintéticos e índice spad como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar**. Bioscience Journal. Uberlandia: Univ Federal Uberlandia, v. 30, n. 1, p. 173-181, 2014.

TSAY YF, SCHROEDER JI, FELDMANN KA, CRAWFORD NM. 1993. **The herbicide sensitivity gene CHL1 of Arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter.** Cell 72: 705–713, 1993.

TSAY YF, CHIU CC, TSAI CB, HO CH, HSU PK. **Nitrate transporters and peptide transporters.** FEBS Letters 581: 2290–2300, 2007.

TRIVELIN, P.C.O.; VITTI, A.C.; OLIVEIRA, M.W.; GAVA, G.J.C. & SARRIÉS, G.A. **Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura.** R. Bras. Ciência e Solo, 26:636-646, 2002b.

TORRES NETO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J.G. & BRESSAN SMITH, R.E. **Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves.** Sci. Hortic., 104:199-209, 2005.

URCHEI, M.A.; RODRIGUES, J.D.; STONE, L.F. **Análise de crescimento de duas cultivares de feijoeiro sob irrigação, em plantio direto e preparo convencional.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.35, n.3, p.497-506, 2000.

VALE, D. W.; PRADO, R. M.; CANTARELLA, H.; FONNSECA, M; AVALHÃES, C. C.; CORREIA, M. A. R.; BARBOSA, M. P. **AMMONIUM AND NITRATE IN SOIL AND RATOON SUGARCANE GROWN IN FUNCTION OF NITROGEN ON OXISOL.** Journal of Plant Nutrition, . 36, n. 2, p. 201–13, 2013.

VIDAL EA, GUTI_ERREZ RA. 2008. **A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in Arabidopsis.** Current Opinion in Plant Biology 11: 521–529, 2008.

WANG, J.; YAXIN L.; ZHU, F.; MING R.; CHEN, L. **Genome-Wide Analysis of Nitrate Transporter (NRT/NPF) Family in Sugarcane Saccharum spontaneum L.** Tropical Plant Biology, 2019.

WILKINSON S, BACON MA, DAVIES WJ. **Nitrate signalling to stomata and growing leaves: interactions with soil drying, ABA, and xylem sap pH in maize.** *Journal of Experimental Botany* v. 58: p. 1705–1716, 2007.

9 ANEXOS

ANEXO 1: VALORES RELATIVOS DE CT (CICLO DO *THRESHOLD*) E MÉDIAS DOS CT'S DE GENES ALVOS NA DOSE 0,5 mM E 5 mM DE NITRATO DE AMONIO.

Genótipos	Dose N	Ct Gene referência GAPDH)	Média Gene alvo a 5 mM de nitrato	Ct Gene alvo (NRT1.1)	Média Gene alvo a 5 mM de nitrato	Ct Gene alvo (NRT2.1)	Média Gene alvo a 5 mM de nitrato	
RB867515	0,5 mM	20.10		28.41		29.70		
		20.99		28.75		29.64		
		20.03		28.49		28.98		
	5 mM	18.69		26.26		28.57		
		20.63		26.80		28.79		
		19.04		27.05		27.30		
		MÉDIAS		19,45		26,70		28,22
	PRBIO-172	0,5 mM	18.45		25.63		27.35	
			19.62		27.81		27.41	
18.80				26.23		27.76		
5 mM		20.99		26.50		28.74		
		21.59		27.90		28.08		
		20.26		26.60		27.64		
		MÉDIAS		20,95		27,00		28,15
PRBIO-137		0,5 mM	18.62		25.57		28.32	
			18.21		26.49		28.48	
	18.80			25.35		28.48		
	5 mM	18.18		25.04		27.33		
		19.05		25.84		27.20		
		19.20		24.73		28.68		
		MÉDIAS		18,81		25,20		27,73

Fonte: O autor (2020).

ANEXO 2: RESULTADOS DE $2^{-\Delta\Delta CT}$ DAS TRIPLICATAS TÉCNICAS DOS GENES NRT1.1 E NRT2.1 OBTIDOS PARA OS GENÓTIPOS RB867515, PRBIO-172 E PRBIO-137 SUBMETIDOS A DOSES DE 0,5 mM E 5 mM DE NITRATO DE AMÔNIO.

Gene alvo	Dose N	RB867515	PRBIO-172	PRBIO-137
NRT1.1	0.5 mM	0.478	0.459	0.681
	0.5 Mm	0.701	0.228	0.270
	0.5 Mm	0.432	0.387	0.899
	5 mM	0.805	1.463	0.723
	5 Mm	2.109	0.835	0.761
	5 Mm	0.589	0.818	1.818
NRT2.1	0.5 mM	0.561	0.310	0.587
	0.5 Mm	1.088	0.668	0.395
	0.5 Mm	0.880	0.298	0.593
	5 mM	0.464	0.688	0.856
	5 Mm	1.516	1.638	1.715
	5 Mm	1.423	0.887	0.681

Fonte: O autor (2020).