UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ORIEL TIAGO KÖLLN

Eficiência de uso de nitrogênio pela cana-de-açúcar: diferenças genotípicas, preferência por amônio e emissão de N_2O

Piracicaba

2016

ORIEL TIAGO KÖLLN

Eficiência de uso de nitrogênio pela cana-de-açúcar: diferenças genotípicas, preferência por amônio e emissão de N_2O

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin

Co-Orientador: Dr. Henrique Coutinho Junqueira Franco

Piracicaba

2016

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Kölln, Oriel Tiago

Eficiência de uso de nitrogênio pela cana-de-açúcar: diferenças genotípicas, preferência por amônio e emissão de N_2O / Oriel Tiago Kölln; orientador Paulo César Ocheuze Trivelin; coorientador Henrique Coutinho Junqueira Franco. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

120 p. : il.

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

1. Adubação nitrogenada 2. Agricultura sustentável 3. Fertilizantes nitrogenados 4. Genótipos 5. Glutamina sintetase 6. Nitrato 7. 15N 8. Plantas produtoras de açúcar 9. Redutase do nitrato I. Título

CDU 631.84 : 633.61

“Você pode ter defeitos, ser ansioso, e viver alguma vez irritado, mas não esqueça que a sua vida é a maior empresa do mundo. Só você pode impedir que vá em declínio. Muitos lhe apreciam, lhe admiram e o amam. Gostaria que lembrasse que ser feliz não é ter um céu sem tempestade, uma estrada sem acidentes, trabalho sem cansaço. Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver a vida, apesar de todos os desafios”

Papa Francisco

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

À minha esposa **Catarinie,** que eu AMO TANTO,
pelo estímulo, cumplicidade, companheirismo,
amizade, carinho, por ter suportado minha ausência
em muitos momentos, pelo o amor incondicional
e por saber que estarás sempre ao meu lado.

DEDICO

Ao meu herói, meu pai **Paulo,**
pelo caráter, pelos ensinamentos
e por todos esforços que fez,
para eu ser o que eu sou.

À minha amorosa mãe **Helenice,**
pelo amor, afeto e dedicação para
tornar meus sonhos realidade.

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida, por estar sempre presente em todos os momentos, e a *N.S.* de Fátima que sempre me protegeu dos perigos de viagens.

Ao Professor Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, pela orientação, pelo apoio, pelo importante treinamento, pelas ideias e amizade para realização deste trabalho.

Ao Pesquisador Dr. Henrique Coutinho Junqueira Franco, por me incentivar, acreditar em mim, pela amizade, pelo apoio, confiança, e por todos ensinamentos nesses quatro anos de convivência, como co-orientador e colega de trabalho.

Ao Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE/CNPEM, por toda infraestrutura, equipamentos, apoio técnico, e ao meu coordenador Oscar Braunbeck, pela liberação para a realização desse trabalho;

Ao Pesquisador Dr. Heitor Cantarella pelas ideias inovadoras, e por compartilhar tamanha experiência.

Ao CENA/USP em especial ao Laboratório de Isótopos Estáveis pelo ensino, suporte técnico e pessoal fundamental nessa tese de doutorado.

Às minhas irmãs Aline e Raquel pelo carinho e preocupação comigo de todos os momentos;

Ao amigo Danilo Alves Ferreira pela auxílio e companheirismo durante seu período no CTBE;

Aos colegas do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE/CNPEM, pesquisadores João Luis, Camila Caldana, Paulo Graziano e Fabio Scarpare, especialistas Guilherme Sanches (Baby), Marina Martins, Sergio de Castro (Serjão), Douglas Forchezatto, Sergio Matsumoto, Luis Alfredo, Rafael Cardoso, e Ed Carlos, analistas Larissa Prado Cruz, Lauren Menandro, e aos alunos João Rossi Neto (JN), Leandro Barbosa (Chupa Cabra), Guilherme Castioni, pela colaboração em todas as etapas desse trabalho.

Aos meus colegas de Pós-Graduação e amigos que sempre lembrarei Eduardo Mariano, José Marcos Leite, Beatriz, Hugo, Carlos Santana pela convivência, troca de experiências, colaboração, ajuda e por partilhar conhecimento.

Aos colegas do laboratório de Isótopos Estáveis Professores José Albertino Bendassolli (sinônimo de alegria), aos funcionários Hugo, Bento, Miguel, Clélber, Magda e José (Pingin) pelo auxílio e saudável convívio que torna o trabalho mais fácil.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma contribuíram na realização dessa importante etapa da minha vida.

RESUMO

KÖLLN, O. T. **Eficiência de uso de nitrogênio pela cana-de-açúcar: diferenças genotípicas, preferência por amônio e emissão de N_2O.** 2016. 120 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

O uso pouco eficiente do nitrogênio (N) por culturas agrícolas é um problema global, que pode diminuir a sustentabilidade da produção da cana-de-açúcar para fins energéticos devido às perdas como as emissões de N_2O oriundas da fertilização nitrogenada. A eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) tem sido pouco estudada em genótipos de cana-de-açúcar, o que pode ser preocupante devido a importância da cultura para o país. O objetivo desse estudo foi avaliar a EUN de genótipos de cana-de-açúcar, verificando se genótipos contrastantes tem preferência de absorção por amônio ao invés de nitrato, e checar se extratos radiculares de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* aumentam a eficiência de utilização de N pela cultura. Para isso três experimentos foram desenvolvidos em condições controladas em casa-de-vegetação e câmara de crescimento. No primeiro deles, 18 genótipos foram submetidos a dois níveis de N: limitante (baixo N) e dose elevada (alto N). Posteriormente, quatro genótipos selecionados quanto a EUN do primeiro experimento, foram cultivados em câmara de crescimento por 69 dias, quando receberam quantidades conhecidas de N-fertilizante marcado no $^{15}NH_4^+$ ou no $^{15}NO_3^-$, sendo avaliados 24 e 72 horas após a aplicação do fertilizante marcado. Um terceiro ensaio foi realizado, em que extratos radiculares de *Brachiaria humidicola* (BCH) e *Saccharum spontaneum* (SCS) foram aplicados ao solo com o intuito de verificar seu potencial como inibidor da nitrificação juntamente com sulfato de amônio (SA), comparando-os com a dicianodiamida (DCD) + SA, e seu efeito para o aumento do aproveitamento do N pela cana-de-açúcar. No experimento de EUN verificou-se grande variação entre os genótipos. Dos 18 genótipos avaliados, seis foram classificados como responsivos e eficientes na utilização de N, três foram não eficientes e responsivos; dois foram eficientes e não responsivos, e sete não eficientes e não responsivos. Esse resultado comprova que a recomendação da adubação nitrogenada pode realmente estar pouco precisa, pois não leva em consideração a EUN de cada genótipo, sendo realizada uma aplicação genérica. As medições de trocas gasosas mostraram que os genótipos mais eficientes na utilização do N, não necessariamente possuem as taxas fotossintéticas mais elevadas, estando a EUN diretamente relacionada à quantidade de raízes das plantas. No segundo trabalho, verificou-se que o N na planta proveniente do fertilizante (NPPF), 72 horas após a aplicação do ^{15}N, foi 36% menor quando a fonte marcada foi NO_3^-, atestando que a cana-de-açúcar tem preferência de absorção por amônio em relação ao nitrato nos primeiros dias após a adubação nitrogenada. Os resultados do terceiro ensaio mostraram que a aplicação de sulfato de amônio (SA), associado ao inibidor sintético DCD, manteve os valores de N-NO_3^- baixos ao longo de todo período de avaliação (60 dias), enquanto que com SA, SA+BCH e SA+SCS houve aumento na concentração de nitrato no solo já a partir de 15 dias após a fertilização. O uso de DCD reduziu o fluxo médio de N_2O durante o período de avaliação em relação ao uso isolado do fertilizante, o que não foi observado com o uso de extratos de raízes de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum*.

Palavras-chave: fertilização nitrogenada, *Saccharum* Spp., nitrato, nitrificação, N-mineral, nutrição de plantas

ABSTRACT

KÖLLN, O. T. **Nitrogen use efficiency by sugarcane: genotypic differences, ammonium preference and N_2O emission.** 2016. 120 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

The low nitrogen use efficient (NUE) from fertilizers is a worldwide concern, which can threaten the sustainability of sugarcane production for energy purposes, due to N_2O emissions from nitrogen fertilization. The nitrogen use efficiency (NUE) has been few studied in sugarcane genotypes, which can be an important issue due the importance of crop for Brazil. The aim of this study was to evaluate the NUE of sugarcane genotypes, checking if contrasting genotypes relating to NUE have preference by ammonium absorption instead of nitrate; and testing if root extracts of *Brachiaria humidicola* and *Saccharum spontaneum* have potential to increase NUE by sugarcane. For this, three experiments were performed under controlled conditions (glasshouse and growth chambers). In the first trial 18 genotypes were subjected to two N rates: limiting (low N) and high (high N). Further, four genotypes were selected regarding to NUE being grown for 69 days at growth chamber, when it received N fertilizer labeled either $^{15}NH_4^+$ or $^{15}NO_3^-$. After that, the plants were assessed at 0, 24 and 72 hours after N application. The third experiment was carried out to evaluated if root extracts of *Brachiaria humidicola* (BCH) and *Saccharum spontaneum* (SCS) with ammonium sulfate (AS) have potential as nitrification inhibitor compared to dicyandiamide (DCD) + AS aiming to increase NUE by sugarcane. In the first trial there was great variation of NUE among genotypes. The results of NUE permitted to classify the genotypes relating to NUE as responsive to N and efficient to use N (six genotypes); not efficient and responsive to N (three genotypes); efficient and not responsive to N (two genotypes); not efficient and not responsive to N (seven genotypes). This result showed that recommendation of nitrogen fertilization currently used in Brazil is quite imprecision, because it not consider NUE of each genotype. The photosynthesis index not showed good correlation to NUE. The best NUE was obtained in genotypes with very well root growth (biomass). The second experiment was verified that sugarcane genotypes has preference by ammonium few days after ^{15}N-fertilizer application (72h). The uptake of ^{15}N-NO_3^- was 36% lesser as compared to ^{15}N-NH_4^+. The results from third experiment showed that the use of ammonium sulfate (AS) plus DCD kept low the NO_3^--N content in the soil for whole time of experiment (60 days), whereas with AS, AS + BCH and AS + SCS there was an increase in the nitrate content in the soil after 15 days of fertilization. The use of DCD together to AS reduced the N_2O emission compared to plants fertilized with only with AS or with AS and others potential natural inhibitors of nitrification (root extracts of *Brachiaria humidicola* and *Saccharum spontaneum*).

Keywords: Nitrogen fertilization, *Saccharum* Spp., nitrate, nitrification, N-mineral, plant nutrition

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2. EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NA FASE INICIAL DE CRESCIMENTO 24

2.1 Introdução 26

2.2 Material e Métodos 28

2.2.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental 28

2.2.2 Condições de crescimento das plantas 30

2.2.3 Avaliações realizadas 31

2.2.4 Análises estatísticas 32

2.3 Resultados 33

2.3.1. Acúmulo de massa seca na parte aérea e raízes e variáveis biométricas 33

2.3.2. Variáveis fotossintéticas e N na folha+1 38

2.3.3. Análise multivariada e componentes principais 40

2.4 Discussão 46

2.5 Conclusões 49

3 PREFERÊNCIA DE ABSORÇÃO DE AMÔNIO POR GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES EM EUN E ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE N 55

3.1 Introdução 57

3.2 Material e Métodos 60

3.2.1 Local, tratamentos e delineamento 60

3.2.2 Condições de crescimento 60

3.2.3 Avaliações 61

3.2.4 Atividade de enzimas do metabolismo de nitrogênio 62

3.2.5. Analises estatísticas 64

3.3. Resultados 64

3.3.1 N inorgânico no solo, acúmulo de massa seca e N na planta 64

3.3.2 Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e atividade das enzimas do metabolismo de N 70

3.4 Discussão 75

3.5 Conclusões 80

4 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS RADICULARES DE *Bracchiaria humidicola* E *Saccharum spontaneum* PARA O AUMENTO DO APROVEITAMENTO DO N EM CANA-DE-AÇÚCAR..... 87

4.1 Introdução 89

4.2 Material e Métodos..... 91

4.2.1 Caracterização e delineamento experimental 91

4.2.2 Condições de crescimento 92

4.2.3 Avaliações realizadas 93

4.3 Resultados..... 96

4.3.1 Parâmetros biométricos e acúmulo de biomassa e N nas plantas..... 96

4.3.2 Disponibilidade de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo 98

4.3.3 Fluxos de N_2O relacionado a aplicação de inibidores de nitrificação 100

4.4 Discussão 102

4.5 Conclusões 106

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 112

APENDICES 115

Apêndice A – Fotos do experimento eficiência de utilização de N em genótipos..... 116

Apêndice B – Fotos experimento de preferência de absorção de amônio de genótipos contrastantes em EUN..... 118

Apêndice C – Fotos do experimento extratos radiculares de Brachiaria humidicola e Saccharum spontaneum 119

1. INTRODUÇÃO

Considerando que as reservas minerais são finitas e os impactos ao meio ambiente e a saúde humana causados pela utilização intensiva de fontes de energia não renováveis (derivados do petróleo), a utilização de biocombustíveis derivados de culturas energéticas, como o bioetanol, despertam grande interesse nacional mundial (GOLDEMBERG, 2008; SEABRA et al., 2011). Este fato, aliado ao aumento contínuo da frota nacional de carros usando bicombustíveis, causou uma expressiva elevação na demanda por etanol hidratado. Assim, melhorar o manejo da cana-de-açúcar a fim de elevar a produtividade dos canaviais é importante para suprir esse aumento na demanda nacional e mundial por etanol. Porém, não há dúvidas que o aumento da produção brasileira de cana-de-açúcar não pode apenas estar relacionado ao aumento da área plantada, mas também, e mais importante, no incremento da produtividade. De acordo com dados da FAO (2014), até 2050 a produção agrícola mundial terá que ser incrementada em 40%, sendo que 90% será resultado da produtividade das culturas e apenas 10% da expansão de novas áreas agricultáveis.

Em relação à cana-de-açúcar, o Brasil desempenha um papel de destaque como maior produtor mundial. Segundo a CONAB (2015), na safra 2015/2016, a área de cultivo ficou próxima dos 9 milhões de hectares, sendo colhidos 658,7 milhões de toneladas de cana com produtividade média de 73 toneladas de colmos industrializáveis (TCH). Porém este valor está muito abaixo do potencial genético da cultura, que é de cerca de 300 TCH (WACLAWOVSKY et al., 2010).

As maiores limitações de produtividade da cana-de-açúcar nas áreas cultivadas do Brasil não se relacionam à radiação solar e temperatura, mas sim ao déficit hídrico, ao manejo inadequado da cultura e a disponibilidade de quantidades adequadas de nutrientes minerais para as plantas, com destaque para o nitrogênio (N) (TRIVELIN, 2000). São muitos os trabalhos encontrados na literatura que mostram a grande importância do N na cultura da cana-de-açúcar (TRIVELIN et al., 2002a; 2002b; VITTI et al., 2007a; 2007b; FRANCO et al., 2010, FRANCO et al., 2011; FORTES et al., 2013; VITTI et al., 2011; FRANCO et al., 2015). O nutriente encontra-se em apenas 1% da massa seca total da planta, mas sua deficiência causa redução na síntese de clorofila, de aminoácidos essenciais e da energia necessária à produção de carboidratos e esqueletos carbônicos, refletindo diretamente no desenvolvimento e rendimento da cultura (RANJITH et al., 1995; MEINZER; ZHU, 1998; EPSTEIN; BLOOM, 2004).

Entretanto, existe uma questão não esclarecida na cultura que é a baixa eficiência de utilização de nitrogênio (EUN) derivado do fertilizante, principalmente em cana-planta. A baixa EUN tem sido atribuída à fixação biológica do N_2 atmosférico; às perdas por lixiviação de N-fertilizante; às condições climáticas como temperatura e pluviosidade; à melhoria da fertilidade solo após a reforma dos canaviais associada à calagem, ao preparo mecânico e à incorporação de restos da cultura anterior; imobilização do N-fertilizante pelos microrganismos do solo; ciclagem de nutrientes da palhada; volatilização de NH_3; desnitrificação e emissões de N_2O derivado das transformações do N no solo (AZEREDO et al., 1986; CARNAÚBA, 1989; URQUIAGA et al., 1992; ORLANDO FILHO et al., 1999; VITTI et al., 2007b; TRIVELIN et al., 2002b; BORGES, 2015). A EUN em plantas é complexa e influenciada por muitos processos fisiológicos, tais como a absorção de N a partir do solo, assimilação em aminoácidos que armazenam N, transporte desse N da fonte para formação de novos tecidos e sinalização e vias regulatórias que mantêm o teor de N da planta e o crescimento vegetativo (MOOSE; BELOW, 2009). O conceito da EUN é amplamente utilizado em estudos para quantificar a absorção de N pela cultura, seja este oriundo do solo ou de fertilizantes, e sua utilização para a produção de biomassa (GOOD et al., 2004; HIROSE, 2012).

Nos últimos 15-20 anos vem ocorrendo, progressivamente, mudança no manejo da cultura de cana-açúcar no Brasil, principalmente com a mudança do tipo de colheita: passando da colheita manual com queima prévia para a colheita mecanizada sem queima (cana-crua), em que se deixa sobre o solo uma camada de resíduos culturais da ordem de 15 Mg ha^{-1}, impactando diretamente a EUN pela cultura (TRIVELIN et al., 2013).

Embora o N derivado do fertilizante seja uma das mais importantes fontes de N para a cultura nos estágios iniciais de seu desenvolvimento (FRANCO et al., 2011), estudos tem mostrado que a contribuição do N-fertilizante na colheita da cultura é quase sempre inferior a 20% (SAMPAIO et al., 1984; TRIVELIN et al., 1995; TRIVELIN et al., 2002). Além disto, o baixo aproveitamento do N-fertilizante pelas plantas de cana-de-açúcar pode levar a contaminação dos ecossistemas próximos às áreas de produção, assim como aumentar o potencial de emissões de N_2O (ALLEN et al., 2010).

No trabalho desenvolvido por Franco et al. (2011), os autores verificaram que o N da adubação nitrogenada representou até 40% do N-total da cana planta nos estágios iniciais de seu desenvolvimento, decrescendo nos estágios de pré-maturidade e maturidade, chegando a patamares de 5 a 10% na colheita. Para cana soca os resultados foram mais expressivos, pois a participação do N-fertilizante, aplicado 90 dias após a colheita da cana planta,

representou até 70% do N total. Este valor foi decrescendo com o decorrer do ciclo da cultura, mas chegando a representar 35% do N total da planta na colheita da primeira soqueira.

Nesse cenário, sabendo-se da importância do N proveniente do fertilizante nos estágios iniciais de crescimento da cultura de cana-de-açúcar, verifica-se uma eficiência de utilização do N-fertilizante pela cultura muita baixa, comumente menor que 50% da dose aplicada (NG KEE KWONG; DEVILLE, 1994; CHAPMAN et al., 1994; BITTENCOURT et al., 1986; SAMPAIO et al., 1984; TRIVELIN et al., 1995; TRIVELIN et al., 1996; GAVA et al., 2001; VITTI et al., 2007). Ainda estudos de grupo de pesquisa australiano, tem demonstrado que a cana-de-açúcar apresenta diferenças genotípicas em relação à eficiência de uso de nitrogênio (EUN), existindo variedades altamente eficientes em utilizar o N disponível para produzir biomassa, enquanto outras têm uma elevada capacidade de armazenar N nos estádios iniciais de desenvolvimento (ROBINSON et al., 2007; ROBINSON et al., 2008; WHAN et al., 2010). Esse fato mostra que a cultura teria uma importante estratégia evolutiva para aumentar a eficiência de uso do elemento pela planta e diminuir os riscos de impactos ambientais decorrentes da fertilização nitrogenada. Por outro lado, a eficiência de uso do nitrogênio tem sido estudada predominantemente em cultura de grãos, como milho, arroz e trigo. Nesses estudos o foco central tem sido a variabilidade genética relativa à EUN, investigada por meio de avaliações de toda a fisiologia da planta, genética quantitativa, variabilidade genética natural e caracterização funcional de genes (HIREL et al., 2007; SYLVESTER-BRADLEY; KINDRED, 2009).

Outro fato que tem ganhado muito interesse de pesquisas nacionais e internacionais é a preferência de algumas espécies de gramíneas pelas formas de N inorgânico na forma amoniacal. Robinson et al. (2011) verificaram que a cana-de-açúcar apresenta preferência de absorção por NH_4^+ ao invés de NO_3^-. O N na forma de NH_4^+, oriundo da ureia ou diretamente de fertilizantes amoniacais, em condições aeróbias, pode ser rapidamente nitrificado e transformando em nitrito (NO_2^-), por meio da ação bioquímica de bactérias do gênero Nitrossomonas. Na sequência, ocorre a oxidação do NO_2^- para nitrato (NO_3^-) que é mediada por bactérias como as do gênero Nitrobacter (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Tradicionalmente, em solos tropicais cultivados, a permanência de N inorgânico na forma de NH_4^+ é muito curta, sendo geralmente de poucas semanas ou até dias. Isso ocorre porque esses solos são bastante ricos em microrganismos nitrificadores que rapidamente transformam o amônio em nitrato. Assim, alternativas que visam conservar por maiores períodos o N na forma de NH_4^+ seriam benéficas para a cana-de-açúcar.

Do ponto de vista de EUN, muitas questões ainda estão em aberto, pois a nutrição de plantas de cana-de-açúcar tem sido pouco estudada pelos cientistas brasileiros, e principalmente, tem sido deixado de lado nos programas de melhoramento, o que pode ser preocupante, tendo em vista que as áreas de expansão da cultura de cana-de-açúcar no Brasil se localizam em solos de baixa fertilidade. Hoje o melhoramento genético de cana-de-açúcar tem como objetivo principal selecionar genótipos que possuem vantagens de rendimento de biomassa e açúcar, resistência a doenças e ao pisoteio da colheita, deixando, portanto, de levar em consideração a seleção de indivíduos que apresentem alta eficiência no uso de nutrientes. Assim, a cana-de-açúcar tem sido cultivada em condições de campo como se o mesmo genótipo fosse plantado em todas as situações de manejo e disponibilidade de N, sendo as doses desse nutriente calculadas em relação à produtividade esperada, não considerando as diferenças genotípicas de EUN. Nesse caso, questões relativas ao conhecimento da EUN de genótipos contrastantes de cana-de-açúcar podem ser de grande interesse para a elaboração de estratégias de manejo de N na cultura, visando à diminuição dos impactos ambientais e aumento da eficiência agronômica dos fertilizantes nitrogenados.

Desse modo, baseando-se nesse contexto, formularam-se as seguintes hipóteses:

- A exigência nutricional em N da cana-de-açúcar varia entre os genótipos brasileiros;
- Eficiência de uso de N pelos genótipos de cana-de-açúcar está relacionado a absorção preferencial de amônia ao invés de nitrato;
- A inibição da nitrificação aumenta a EUN pela cana-de-açúcar.

Para testar essas hipóteses essa tese tem como objetivos: I) Quantificar a eficiência de utilização de N em diferentes genótipos de cana-de-açúcar submetidos a doses de N; II)Verificar a preferência de absorção de amônio por genótipos contrastantes em EUN; III) avaliar o potencial de extratos radiculares de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* comparados ao inibidor de nitrificação DCD (Dicianodiamida) para aumentar a absorção de N de plantas de cana-de-açúcar adubadas com sulfato de amônio; IV) Quantificar as emissão de N_2O do solo com a utilização desses inibidores;

Para atingir esses objetivos, elaborou-se essa tese em três capítulos o primeiro visando testar a EUN dos genótipos mais contrastantes do banco de germoplasma da RIDESA programa de melhoramento mais representativo do Brasil em termos de variedades plantadas por área de cultivo: 54% da área canavieira de acordo com Chapola et al. (2014) com o título “Eficiência de utilização de N de genótipos de cana-de-açúcar na fase inicial de crescimento”. O segundo capítulo, com base no resultado do primeiro experimento, objetivou verificar se há preferência de absorção por amônio ao invés de nitrato em genótipos contrastantes em EUN, com o título

“Preferência de absorção de amônio de genótipos de cana-de-açúcar contrastantes em EUN e atividades das enzimas do metabolismo de N. Por fim, o terceiro, intitulado “Avaliação de extratos radiculares de *Bracchiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* para o aumento do aproveitamento do N em cana-de-açúcar” que foi apresentado na forma de pôster no *16th World Fertilizer Congress of CIEC* e posteriormente, convidado para ser publicado na forma de artigo científico na edição especial da revista *Scientia Agricola*[1], cujo o objetivo foi verificar se extratos de plantas com histórico de inibição da nitrificação podem aumentar a EUN tendo em vista a preferência da planta por NH_4^+ como reporta a literatura (ROBINSON et al., 2011).

[1] Scientia Agricola, Piracicaba, v. 73, n.1 p, 34-42, 2016

Referências

ALLEN, D. E.; KINGSTON, G.; RENNENBERG, H.; DALAL, R. C.; SCHMIDT, S. Effect of nitrogen fertilizer management and waterlogging on nitrous oxide emission from subtropical sugarcane soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment,** Amsterdam, v. 136, p. 209–217, 2010.

AZEREDO, D. F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J. R. Nitrogênio em cana planta – doses e fracionamento. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos,** Piracicaba, v. 6, p. 26-33, 1986.

BITTENCOURT, V. C.; FAGANELLO, B. F.; SALATA, J. C. Eficiência da adubação nitrogenada em cana-de-açúcar (planta). **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos,** Piracicaba, v. 5, n. 1, p. 26-33, 1986.

BORGES, C. D. **Monitoramento quantitativo e temporal de genes de origem microbiana associados às emissões de gases do efeito estufa sob diferentes usos da terra.** 2015. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

CARNAÚBA, B. A. A. **Eficiência de utilização e efeito residual da uréia - 15N em cana-de-açúcar (Saccharum spp.), em condições de campo.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

CHAPMAN, L. S.; HAYSOM, M. B. C.; SAFFIGNA, P. G. The recovery of 15N from labelled urea fertilizer in crop components of sugarcane and in soil profiles. **Australian Journal of Agricultural Research,** Melbourne, v. 45, p. 1577-1585, 1994.

COMPANHIA NACIONAL DO ABASTECIMENTO - CONAB. **Levantamentos de safras**. Brasília, DF, 2015. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=> Acesso em: 10 set. 2015.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants**: principles and perspectives. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 400 p.

FAO. **FAOSTAT**. Rome, 2015. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx> Acesso em: 10 out. 2015.

FERNANDES JUNIOR, A. R. **Censo Varietal 2014, Ridesa UFSCar.** Disponível em: <http://www.canaonline.com.br/conteudo/lancado-o-censo-varietal> Acesso em: 18 de nov. 2015.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Stalk yield and technological attributes of planted cane as related to nitrogen fertilization. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 67, p. 579–590, 2010.

FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; VITTI, A. C.; FARONI, C. E.; OLIVEIRA, E. C. A.; FORTES, C.; FERREIRA, D. A.; KOLLN, O. T.; GARSIDE, A. L.; TRIVELIN, P. C. O. Residual recovery and yield performance of nitrogen fertilizer applied at sugarcane planting. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 72, p. 528-534, 2015.

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 in Brazilian field conditions. **Field Crops Research,** Amsterdam, v. 121, p. 29-41, 2011.

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

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels,** London, v. 1, p. 1-7, 2008.

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

HIREL, B.; Le GOUIS, J.; NEY, B; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 58, p. 2369-2387, 2007.

HIROSE, T. Leaf-level nitrogen use efficiency: definition and importance, **Oecologia,** Berlin, v. 169, p. 591–597, 2012.

MEINZER, F. C.; ZHU, J. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C4 CO_2 concentrating system, and therefore quantum yield, in saccharum (sugarcane) species. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 49, p. 1227-1234, 1998.

MOOSE, S. BELOW, F. E. Biotechnology approaches to improving maize nitrogen use efficiency. In: KRIZ, A. L.; LARKINS, B. A. (Ed.). **Molecular genetics approaches to maize improvement**. Heidelberg: Springer, 2009. P. 65–77. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 63).

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Fixação biológica do nitrogênio atmosférico. In: _____. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: Editora UFLA, 2006. p. 449-542.

NG KEE KWONG, K. F.; DEVILLE, J. Application of 15N-labelled urea to sugar cane through a drip-irrigation system in Mauritius. **Fertilizer Research,** The Hague, v. 39, p. 223-228, 1994.

ORLANDO FILHO, J.; RODELLA, A. A.; BELTRAME, J. A.; LAVORENTI, N. A. Doses, fontes e formas de aplicação de nitrogênio em cana-de-açúcar. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos,** Piracicaba, v. 17, n. 4, p. 39-41, 1999.

RANJITH, S. A.; MEIZER, F. C.; PERRY, M. H.; THOM, M. Partitioning of carboxylase activity in nitrogen-stressed sugarcane and its relationship to bundle sheath leakiness to CO2, photosynthesis and carbon isotope discrimination. **Australian Journal of Plant Physiology,** Melbourne, v. 22, p. 903-911, 1995.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; SOPER, K. V. F.; GAMAGE, J. H. H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PloS One,** San Francisco, v. 6, n. 4, e19045, 2011.

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

ROBINSON, N.; FLETCHER, A.; WHAN, A.; VINALL, K.; BRACKIN, R.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Sustainable sugarcane production systems: reducing plant nitrogen demand. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology,** Brisbane, v. 30, p. 212-219, 2008.

SALCEDO, I. H.; SAMPAIO, E. V. S. B.; ALVES, G. D. Mineralização do carbono e do nitrogênio em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 9, n. 1, p. 33-38, 1985.

SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTAMY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência de utilização de uréia-^{15}N em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 19, n. 8, p. 943-949, 1984.

SEABRA, J. E. A.; MACEDO, I. C.; CHUM, H. L.; FARONI, C. E.; SARTO, C. A. Life cycle assessment of Brazilian sugarcane products: GHG emissions and energy use. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining,** Hoboken, v. 5, p. 519-532, 2011.

SYLVESTER-BRADDLEY, R.; KINDRED, D. R. Analyzing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 60, p. 1939-1951, 2009.

TRIVELIN, P. C. O. **Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar**: três casos estudados com uso do traçador ^{15}N. 2000. 143 p. Tese (Livre-Docência) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L.; RODRIQUES, J. C. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 30, n. 12, p. 1375-1385, 1995.

TRIVELIN, P. C. O.; RODRIGUES, J. C. S.; VICTORIA, R. L. Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de início de safra do nitrogênio da aquamônia-15N e uréia-15N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 31, n. 2, p. 89-99, 1996.

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 em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 26, n. 3, p. 636-646, 2002a.

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

TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; FERREIRA, D. A.; VITTI, A. C.; FORTES, C.; FARONI, C. E.; OLIVEIRA, E. C. A.; CANTARELLA, H. Impact of sugarcane trash on fertilizer requirements for São Paulo, Brazil. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 70, n. 5, p. 345–352, 2013.

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

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 46, p. 287-293, 2011.

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 residual e do sistema radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v.42, p. 249–256, 2007.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; FRANCO, H. C. J.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre os resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 31, p.491-498, 2007a.

WHAN, A.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S.; AITKEN, K. A quantitative genetics approach to nitrogen use efficiency in sugarcane. **Functional Plant Biology,** Collingwood, v. 37, n. 5, p. 448-454, 2010.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal,** Oxford, v.8, p. 263-276, 2010.

2. EFICIÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR NA FASE INICIAL DE CRESCIMENTO

Resumo

Com o advento do processo de fixação industrial de N desenvolvido por Haber e Bosch, a agricultura mundial teve um salto muito grande nos seus níveis de produção. Atualmente, a adubação nitrogenada é imprescindível para quase todas as culturas, para a manutenção de níveis adequados de produtividade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de utilização em N de diferentes genótipos de cana-de-açúcar na fase inicial de crescimento. Nesse sentido desenvolveu-se um experimento em condições controladas (casa de vegetação) com 18 genótipos e dois níveis de N, sendo baixo N (10 mg kg^{-1} - limitante) e alto N (270 mg kg^{-1} - dose elevada). O experimento foi planejado em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Depois de 60 dias de crescimento quantificou-se as trocas gasosas da folha, o acúmulo de massa seca e de N, assim como parâmetros biométricos da planta (altura, diâmetro, N na folha+1 e índice SPAD). Verificou-se grande variação na eficiência de utilização de N (EUN) pelos genótipos de cana-de-açúcar. Dos 18 genótipos avaliados, seis foram classificados como responsivos a N e eficientes na utilização de N, três foram não eficientes e responsivos; dois foram eficientes e não responsivos, e sete não eficientes e não responsivos. O genótipo que obteve a maior EUN tanto para alto N como para baixo N foi o RB975375. Verificaram-se taxas fotossintéticas pelo menos três vezes maior em plantas em dose de alto N em relação aquelas cultivadas em baixo N. Por meio da análise de correlação de Pearson e de Componentes Principais, verificou-se que a principal característica associada a EUN é a massa seca de raízes (MSR). Os genótipos avaliados apresentaram contrastes em relação a resposta e a eficiência de utilização do N. Esse resultado preliminar comprovam, em parte, que a recomendação de adubação utilizada atualmente, sem considerar a eficiência de utilização do N, pode estar equivocada. As medições de trocas gasosas mostraram que os genótipos mais eficientes na utilização do N, não possuem, necessariamente, as taxas fotossintéticas mais elevadas e que para o presente estudo a EUN foi diretamente relacionada a quantidade de raízes das plantas.

Palavras – chave: Adubação nitrogenada, *Saccharum* Spp., fotossíntese, análise multivariada

NITROGEN USE EFFICIENCY OF SUGARCANE GENOTYPES IN THE INITIAL GROWTH PHASES

Abstract

The advent of the industrial nitrogen fixation process developed by Haber Bosch, had a very big leap in the agriculture production levels worldwide. Today, the nitrogen fertilization is essential to almost all crops, to obtain adequate levels of yield. The aim of this study was to evaluate the nitrogen use efficiency of genotypes of sugarcane in the initial growth phase. For this, a trial in controlled conditions (glasshouse) was developed with 18 genotypes and two levels of N, low N (10 mg kg^{-1} - limiting) and high N (270 mg k^{-1} - high dose). The experiment was planed in a completely randomized design with four replications. After 60 days of growth, gas exchange of leave was measured, dry matter, N accumulation, as well as biometric parameters of the plant (height, diameter, N leaf+1 and SPAD index) were measured. There was a wide variation in the N use efficiency (NUE) by sugarcane genotypes. The results of NUE permitted to classify the genotypes as responsive to N and efficient to N use (six genotypes); not efficient and responsive to N (three genotypes); efficient and not responsive to N (two genotypes); not efficient and not responsive to N (seven genotypes). The genotype that had the highest NUE both in high and low N was RB975375. The photosynthetic rates were three times higher in plants in high N in comparison to those grown in low N. Through analyses of the Pearson correlation and principal component, it was found that the main feature associated with NUE is dry matter of roots (DMR). This result showed that recommendation of nitrogen fertilization currently used in Brazil is quite imprecise, because it does not consider NUE of each genotype. The measurements of gas exchange showed that the most efficient genotypes in N not necessarily present higher photosynthetic rates and for this study NUE could be directly related to the amount of plant roots.

Key-words: Nitrogen fertilization, *Saccharum* Spp., photosynthesis, multivariate analysis

2.1 Introdução

A prática da adubação nitrogenada é muito importante para a manutenção da produção em sistemas agrícolas, assegurando bons níveis de produtividade para as culturas. Porém, é conhecido que aplicações excessivas desse nutriente podem gerar perdas e consequentemente danos ambientais associados (THORBURN et al., 2011; ALLEN et al., 2012).

A cana-de-açúcar por ser uma *poaceae*, de mecanismo fotossintético C4, que apresenta uma elevada produção de biomassa, exige assim uma grande demanda de água e nutrientes, com destaque para o N (ARRUDA, 2011). A absorção desse elemento pela cana-de-açúcar varia de 100 até 300 kg ha^{-1} para a produção de 100 Mg ha^{-1} de colmos (CANTARELLA, 2007). Estudos constataram que a quantidade de N remanescente nos resíduos vegetais após a colheita anterior de cana, sem queima, é de 40 a 80 kg ha^{-1} de N (VITTI et al., 2011; FORTES et al., 2012). Mesmo assim, quantidades significativas de N-fertilizante (100 a 150 kg ha^{-1} de N) são necessárias para garantir a demanda nutricional da cultura em N (VITTI et al., 2007).

No entanto, de acordo com Robinson et al. (2011), em alguns países as doses de N utilizadas em cana-de-açúcar ultrapassam os 200 kg ha^{-1}, podendo chegar a 400 kg ha^{-1}, potencializando os riscos de danos ambientais. Já no Brasil as doses usadas são menores, da ordem de 100 kg ha^{-1}. No entanto, independente da dose de N-fertilizante empregada na lavoura de cana-de-açúcar, a eficiência de uso deste elemento pela planta geralmente é menor que 50%, valor esse inferior ao observado na maioria das outras culturas que se situa entre 50 a 70% (CANTARELLA, 2007). Estudos da literatura indicam que o aproveitamento do N-fertilizante aplicado em solo cultivado com cana-de-açúcar pode variar, em média, de 20 a 40% (PRASERTSAK et al., 2002; TRIVELIN et al., 2002; FRANCO et al., 2008; FRANCO et al., 2011; VITTI et al., 2011). Outros trabalhos têm sido realizados também buscando o melhor aproveitamento do N pela cana de açúcar, seja utilizando ferramentas de agricultura de precisão (PORTZ et al., 2012; AMARAL et al., 2015; ROSA et al., 2015) ou uso de outras fontes de N (VITTI et al., 2007; VIEIRA et al., 2010; MEGDA et al., 2012; MARIANO et al., 2015). A eficiência de utilização do N (EUN) em plantas é complexa e influenciada por muitos processos fisiológicos, tais como a absorção de N a partir do solo, assimilação em aminoácidos que armazenam N, transporte desse N da fonte para formação de novos tecidos e sinalização e vias regulatórias que mantém o status de N da planta e o crescimento (MOOSE; BELOW, 2009). O conceito da EUN é amplamente utilizado em estudos para quantificar a absorção de N do solo ou do fertilizante e sua utilização para a produção de biomassa (GOOD et al., 2004; HIROSE, 2012). Ao longo dos anos foram propostas várias definições de

EUN, que diferem em alguns aspectos básicos discutidos em Good et al. (2004) e Brauer e Shelp (2010). Por exemplo, em ensaios anteriores com cana-de-açúcar, a EUN de genótipos foi calculada em termos de rendimento de sacarose (SCHUMANN et al., 1998), produção de biomassa (ROBINSON et al., 2007; WHAN et al., 2010) e biomassa em vitro (HAJARI et al., 2015).

Independentemente da sua definição exata, as características da EUN são geralmente determinadas no campo para avaliar os fenótipos e a produtividade de genótipos em resposta a diferentes aplicações de N sob diferentes condições ambientais. No entanto, as condições não são uniformes e podem variar em termos de distribuição espacial e temporal de N no solo (WEIGEL et al., 2010; WEIGEL; MILES, 2013), sendo muitas vezes difícil avaliar as respostas biológicas, com precisão, para formas específicas de N e concentrações em condições de campo. Além disto, os testes de campo também demandam tempo e trabalho intensivo e as medições são normalmente restrita a estudos de biomassa da parte aérea devido as dificuldades de análise da biomassa radicular. Em cana-de-açúcar, como em outras culturas, experimentos em vasos e sistemas hidropônicos são empregados como abordagens alternativas (MOOSE; BELOW, 2009; POORTER et al., 2012), ou mesmo como estudos-piloto antes de determinações de campo (SCHUMANN et al., 1998; ROBINSON et al., 2007; BEATTY et al., 2010) para caracterizar as respostas fisiológicas e/ou moleculares de plantas ao N.

A EUN tem sido estudada predominantemente em cultura de grãos, como milho, arroz e trigo. Nesses estudos o foco central tem sido a variabilidade genética relativa à EUN, investigada por meio de avaliações da fisiologia da planta, genética quantitativa, variabilidade genética natural (*forward genetics*) e caracterização funcional de genes (*reverse genetics*) (FAGUERIA; BELIGAR, 2005; HIREL et al., 2007; SYLVESTER-BRADLEY; KINDRED, 2009). Tentativas similares têm surgido para avaliar a EUN em cana-de-açúcar, visando, principalmente, à identificação e quantificação de genótipos mais eficientes na utilização de N (ROBINSON et al., 2007; WHAN et al., 2010, HAJARI et al., 2015). Outra forma possível de avaliar a EUN em plantas é por meio da capacidade fotossintética (fotossíntese líquida em saturação de luz), pois a fotossíntese de uma folha é fortemente correlacionada com seu conteúdo de N, por esse ter relação direta com a clorofila. Para plantas em ambientes naturais essa relação segue uma função de potência: $A_{max} = a.N^b$, em que: A_{max} é capacidade fotossintética (nmol CO_2 g^{-1} s^{-1}); a é o intercepto de uma representação gráfica log-log; N é o nitrogênio foliar (mg g^{-1}) e b é um fator de escala (EPSTEIN; BLOOM, 2004). De acordo com a revisão desses autores, o fator de

escala *b* demonstrou ser maior que 1, o que significa que a capacidade fotossintética da planta aumenta exponencialmente com o conteúdo foliar de N.

Atualmente, no Brasil, o melhoramento genético de cana-de-açúcar tem como objetivos principais selecionar genótipos que transmitam vantagens de rendimento de biomassa, resistência a doenças e ao pisoteio de colhedoras, sem levar em consideração a eficiência de uso de nutrientes. Assim, a cana-de-açúcar tem sido cultivada em condições de campo como se o mesmo genótipo fosse plantado em todas as situações de manejo e disponibilidade de N, sendo as doses desse nutriente calculadas em relação à produtividade esperada, não considerando as diferenças genotípicas de EUN. Com base nos estudos citados acima é pertinente investigar se a exigência nutricional da cultura de cana-de-açúcar é a mesma para os genótipos brasileiros cultivados atualmente.

Diante do exposto, o objetivo deste capítulo foi avaliar a eficiência de utilização de N de diferentes genótipos de cana-de-açúcar submetidos a dois níveis de Nitrogênio, sendo baixo N (limitante) e alto N (dose elevada).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Localização, tratamentos e delineamento experimental

Este estudo foi realizado em casa de vegetação (CV) no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol – CTBE/CNPEM – Campinas/SP (22º 48' 09" S, 47º 03' 11" O). Para o desenvolvimento dessa etapa foram selecionados 20 genótipos de cana-de-açúcar do programa de melhoramento RIDESA – Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético, material cedido pelo programa por meio de uma parceria estabelecida entre CTBE e RIDESA. Optou-se por escolher um único programa devido à representatividade sua Região Centro Sul do Brasil e também por apresentar diferenças entre parentais (Tabela 2.1). Dentre os 20 genótipos selecionados dois não obtiveram germinação RB855156 e RB835054, impossibilitando a sua avaliação nesse experimento.

Tabela 2.1. Genótipos selecionados para a realização do experimento de EUN.

Nº	Variedade	Progenitores		Ano Cruzamento	Ano Liberação	Representatividade*		
		Mãe	Pai			Área (ha)	%	Pos.
1	**RB867515**	RB72454	?	1986	1998	921.350	26,29	1º
2	**RB855453**	TUC71-7	?	1985	1995	248.646	7,1	3º
3	**RB966928**	RB855156	RB815690	1996	2010	208.697	5,96	4º
* *4*	**RB855156**	RB72454	TUC71-7	1985	1995	176.926	5,05	5º
5	**RB92579**	RB75126	RB72199	1992	2003	150.812	4,3	6º
6	**RB855536**	SP70-1143	RB72454	1985	1998	91.640	2,62	8º
* *7*	**RB835054**	RB72454	NA56-79	1983	1998	50.899	1,45	14º
8	**RB935744**	RB835089	RB765418	1993	2006	47.864	1,37	15º
9	**RB835486**	L60-14	?	1983	1992	33.288	0,95	20º
10	**RB72454**	CP53-76	?	1972	1982	28.966	0,83	21º
11	**RB928064**	SP70-1143	?	1992	2002	19.695	0,6	24º
12	**RB965902**	RB855536	RB855453	1996	2010	15.801	0,45	30º
13	**RB937570**	SP70-1143	RB72454	1993	2010	14.840	0,42	35º
14	**RB965917**	RB855453	RB855536	1996	2010	2.189	0,06	56º
15	**RB975952**	RB835486	RB825548	1997	2014 ?	707	0,02	83º
16	**RB975201**	RB855113	?	1997	2014 ?	155	0,004	129º
17	**RB975242**	F147	?	1997	2014 ?	7	0,0002	250º
18	**RB985476**	H53-3989	RB855206	1998	2014 ?	-	-	-
19	**RB975375**	RB855035	RB855536	1997	?	-	-	-
20	**RB995867**	F150	?	1999	?	-	-	-

*Genótipos que não apresentaram germinação suficientes para realização do estudo. Pos.: Posição na representatividade; em vermelho genótipos não disponíveis comercialmente, considerados clones potencias com liberação prevista nos próximos dois anos. *Fonte:* RIDESA

Esse experimento foi desenvolvido em delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições e duas doses de N – fertilizante, sendo baixo N (10 mg kg^{-1} - limitante) e alto N (270 mg kg^{-1} - dose elevada). Cada unidade experimental foi constituída de um pote com capacidade de 4 L sem orifícios na base, preenchido com 3,4 kg de areia fina lavada. Antes da instalação do experimento foi realizada a caracterização química e física da areia (Tabela 2.2). Para elevar os teores de cálcio e magnésio aplicou-se 1,0 g, por vaso, de calcário (calcário dolomítico PRNT=90%). Depois os vasos foram incubados por 14 dias com a umidade ajustada para 70% da capacidade máxima de retenção de água (CRAmáx).

Tabela 2.2. Características químicas e físicas da areia utilizada no experimento.

pH	M.O.	Al	P	S	H+Al	K	Ca	Mg	CTC	V	Areia	Silte	Argila
	g dm^{-3}	---- mg dm^{-3}----			---------mmol$_c$$dm^{-3}$--------					%	----------g kg^{-1}----------		
5,4*	5	0	2,5	34,5	8	0,4	6	1	15,4	48	865**	209	61

*Análise realizada segundo metodologia de Raij (2001), **Análise realizada segundo metodologia da Embrapa, (1997).

2.2.2 Condições de crescimento das plantas

As mudas dos genótipos (mini toletes de 1 gema com 25 mm de comprimento) foram obtidas do terço médio de colmos maduros, de plantas cultivadas em condições de campo controlado (viveiro) de excelente sanidade. Após a coleta dos colmos sementes, foram germinados e cultivados por 4 semanas em bandejas de crescimento, na presença de vermiculita inerte sem a adição de nutrientes. Ao término deste período, cada plântula foi transferida definitivamente para um pote plástico com fundo fechado (para evitar perdas de solução) e capacidade de 4 L. As plantas permaneceram um período de adaptação de (7 dias) antes da aplicação dos nutrientes P, K e micronutrientes, os quais não eram fonte de estudo, e 15 dias antes da aplicação dos tratamentos de N.

Em cada vaso, 7 dias após o transplante das mudas, foram aplicados 100 mg kg^{-1} de P na forma de fosfato de cálcio $Ca(H_2PO_4)_2$ e 50 mg kg^{-1} de K na forma de sulfato de potássio K_2SO_4 na forma de solução. As doses de micronutrientes foram 3 mg kg^{-1} de Zn (sulfato de zinco p.a.), 1 mg kg^{-1} de B (ácido bórico p.a.), 0,5 mg kg^{-1} de Cu (sulfato de cobre p.a.), 5 mg kg^{-1} de Fe (EDTA férrico p.a.), 4 mg kg^{-1} de Mn (sulfato de manganês p.a.) e 0,3 mg kg^{-1} de Mo (molibidato de sódio p.a.). A aplicação dos micronutrientes foi parcelada em duas aplicações: aos 7 dias e aos 35 após o transplante assim como mais 70 mg kg^{-1} de K na forma de cloreto de potássio (KCl), totalizando 120 mg kg^{-1} de K.

A umidade dos vasos foi mantida em 70 % da capacidade máxima de retenção. Diariamente 10% dos vasos foram pesados para a realização do cálculo da massa de água perdida, sendo a reposição de água realizada com auxílio de provetas graduadas.

A aplicação do tratamento 270 mg kg^{-1} de N (alto N) foi realizada de forma parcelada, sendo que inicialmente todos os vasos receberam 10 mg kg^{-1}, referente a dose baixo N, na forma de nitrato de amônio NH_4NO_3, 15 dias depois forneceram-se 80 mg kg^{-1} solo na forma de nitrato de amônio NH_4NO_3 somente para dose alto N, que recebeu mais duas parcelas de 90 mg kg^{-1} de solo de NH_4NO_3 em intervalos de 15 dias.

2.2.3 Avaliações realizadas

Aos 60 dias após o início da aplicação dos tratamentos foi realizado a avaliação final do experimento, com a determinação das variáveis: *Índice Spad* (SPAD), usando um aparelho clorofilômetro (Minolta SPAD-502, Konica Minolta, New Jersey, EUA), em que a medida da parcela foi obtida da média de 3 leituras da folha +1; *altura das plantas* (AL), medida da base do colmo até a inserção da folha +1; *diâmetro das plantas* (DIA), medido no terço médio das plantas.

As medidas de trocas gasosas (taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração) foram obtidas utilizando um medidor portátil de fotossíntese (LI-6400 XT, LiCor, EUA), equipado com uma câmara de fluorescência (LI-6400-40, LiCor). Cada medição foi executada na porção mediana da folha +1 de cada planta evitando sempre a nervura central para o completo fechamento da câmara. Durante todo o procedimento a concentração de CO_2 dentro da câmara do equipamento foi mantida em 400 ppm com o uso de um cilindro de CO_2 pressurizado acoplado ao medidor de trocas gasosas e luz de 1500 µM m^{-2} s^{-1}. A temperatura da folha foi mantida à 34°C ± 1.

Após a coleta dos dados biométricos, medições de trocas gasosas e coleta da folha+1 os vasos foram desmontados. As partes das plantas foram coletadas separadamente em folhas, caules e raízes para a determinação da biomassa seca, obtida em estufa de circulação forçada de ar a 65°C. Posteriormente, as amostras de planta foram moídas em moinho de facas tipo Wiley, sendo quantificados os teores de N (g kg^{-1}) nas folhas, caules, e raízes segundo metodologia de Nelson; Sommers, (1973). Com os dados de massa seca e o N total acumulado na planta calculou-se a eficiência de uso de N (EUN) para todos os genótipos avaliados, dividindo a massa seca total da planta em gramas pelo N total acumulado em mg kg no tecido, assim a EUN é dada em (gramas de massa seca g MS/ gramas de N no tecido g N). Depois com as leituras das trocas gasosas e o teor de N na folha +1 de uma área especifica, nesse caso 2 cm^2, calculou-se a eficiência de utilização de nitrogênio na fotossíntese EUNF em µmol CO_2 mol N^{-1}. Para a realização dessas análises na folha+1 da porção mediana aonde realizam-se as medições de assimilação líquida CO_2 foi retirada uma amostra da folha de 2 cm^2 para determinação do N. As análises foram realizadas em espectrômetro de massas (modelo ANCA-GSL Hydra 20-20 SERCON Co., Crewe, GBR) acoplado a um analisador automático de N (BARRIE; PROSSER, 1996), devido à baixa quantidade de massa das amostras.

Durante o período experimental foram coletados os dados de umidade e temperatura da casa-de-vegetação registrados a cada hora por meio de um *"dataloger"*. A temperatura média durante o período experimental foi de 23 ºC, e a umidade relativa do ar foi 80% (Figura 2.1).

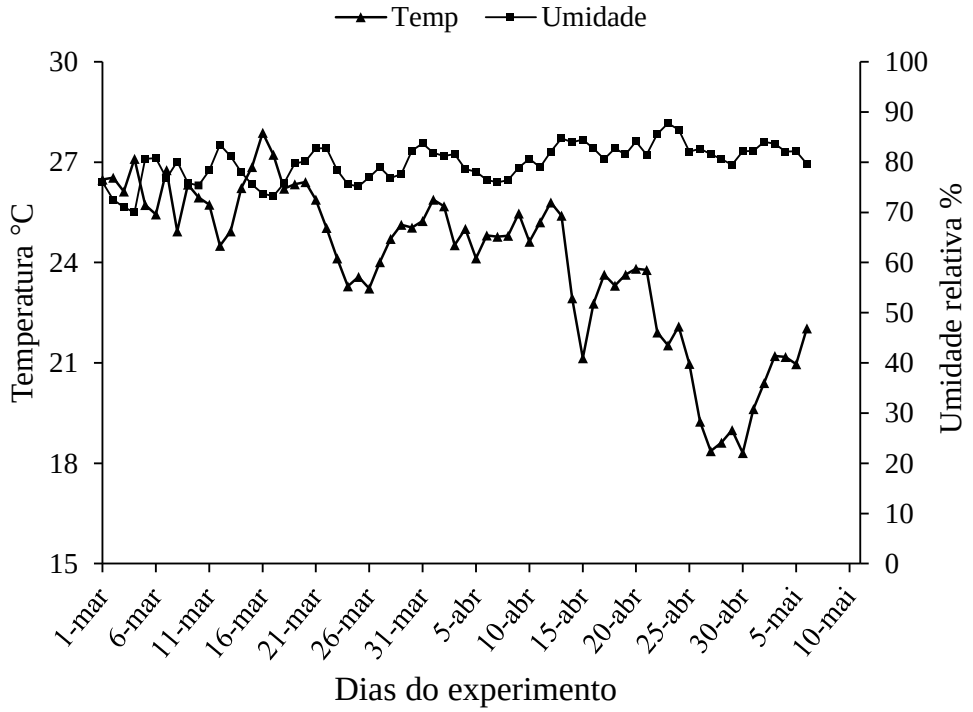


Figura 2.1. Temperatura média e umidade relativa do ar durante o período experimental (ano de 2014).

2.2.4 Análises estatísticas

Todas as variáveis foram submetidas inicialmente à uma análise de variância (ANOVA), pelo teste F, por meio do programa SISVAR (versão 5.6, UFLA, Lavras, MG), para comparação entre os tratamentos avaliados. Para as variáveis acúmulo de biomassa, variáveis biométricas e teor N na planta, quando significativo ($P<0,05$), utilizou o teste Scott Knott para a comparação entre os genótipos e teste de Tukey para comparação entre os dois níveis de N ($p<0,05$). Optou-se por utilizar o teste Scott Knott pois esse é o mais recomendado quanto se tem muitos tratamentos, tendo em vista que nesse teste a razão de verossimilhança é usada para testar a significância em que *n* podem ser divididos, separando, dessa forma, os tratamentos em grupos (RAMALHO et al., 2000).

Utilizando metodologia descrita em Robinson et al. (2007) a qual utiliza a média de uma amostra para separar em quadrantes a distribuição dos genótipos, foi possível diferenciar os materiais quanto a eficiência e a resposta a adubação com N. Nesse caso utilizou-se no eixo x a eficiência de utilização de N em baixo N e no eixo y a eficiência de utilização em alto N. Assim é possível identificar no eixo x genótipos que possuem alta EUN, e no eixo y genótipos que apresentam elevada resposta ao N.

Em seguida realizou-se uma análise estatística exploratória de todos os parâmetros avaliados no experimento. O objetivo foi conhecer as medidas de tendência central e dispersão dos dados, bem como a normalidade e existência de valores discrepantes nos mesmos, utilizando-se para isto as médias das repetições dos tratamentos empregados. Esta análise apresenta um caráter exploratório para conhecimento da distribuição e comportamento dos dados. Com o objetivo de investigar as causas de variabilidade da EUN nos genótipos, avaliou-se a estrutura de correlação deste fator (*EUN)* com os parâmetros biométricos, acúmulo de biomassa, e assimilação líquida de CO_2 das plantas por meio da correlação de *Pearson* e da análise de componentes principais (ACP), utilizando-se o programa STATISTICA 12® (StatSoft, Dell Software, Oklahoma, EUA). A ACP, por meio da redução de dimensionalidade do problema, permite a interpretação dos diversos parâmetros avaliados de maneira mais simples e eficaz, resultando em uma aplicação robusta para identificação dos genótipos eficientes.

2.3 Resultados

2.3.1. Acúmulo de massa seca na parte aérea e raízes e variáveis biométricas

Houve diferenças entre os genótipos para o acúmulo de massa seca na parte aérea (MSPA) e massa seca das raízes (MSR) apenas para dose de 270 mg kg^{-1} de N (alto N). O acúmulo de MSPA variou de 11,6 a 18 g em alto N e de 2,3 a 5,2 g em baixo N. Para o acúmulo de MSR as médias variaram de 4,9 a 8,8 g em alto N e de 2,0 a 4,5 g em baixo N (Figura 2.2). As maiores diferenças entre os genótipos ocorreram quando esses foram cultivados em baixo N do que em alto, tanto para MSPA como para MSR (Figura 2.2).

Os genótipos que se destacaram para a produção de MSPA em ordem decrescente foram RB975201, RB855453, RB835486, RB92579, RB995867, RB935744, RB928064, RB966928, RB975375, RB867515 e RB985476. No acúmulo de MSR as maiores biomassas foram obtidas também, em ordem decrescente, pelo RB975375, RB985476, RB867515, RB965917, RB995867, RB928064, RB72454, RB855453 e RB855536. Para todos os genótipos, no acumulo de MSPA e MSR, houve diferença entre a dose baixo N e alto N (teste Tukey $p<0,05$).

As variáveis biométricas como altura de plantas, diâmetro, índice SPAD e teor de N da folha+1 não foram satisfatórias para avaliar a resposta a adubação nitrogenada pelos genótipos. Não houve diferenças entre os genótipos quando cultivados em baixo N para todas as variáveis, porém para alto N os genótipos diferiram entre si (Tabela 2.3). Pelo teste estatístico foi possível

separar os genótipos cultivados em alto N em 3 grupos para todas as variáveis, com destaque para dois genótipos em especial: RB855453 sendo superior aos demais para todas as variáveis e RB867515, sendo o segundo melhor para todos os parâmetros. Para os demais genótipos houve variação na resposta dos parâmetros biométrico e índice SPAD em relação a aplicação de N (Tabela 2.3).

Observou-se uma altura média dos genótipos de 13,7 e 26,3 cm para os níveis baixo N e alto N respectivamente, para o diâmetro as médias variaram de 7,9 a 13,7 mm para baixo N e alto N respectivamente (Tabela 2.3). É notório que a dose baixa utilizada para realização desse trabalho foi extremamente restritiva, tal fato pode ser observado inclusive nos parâmetros biométricos que apresentaram metade daqueles medidos nas plantas sob alto N. Os teores de N na folha+1 foram pelo menos três vezes maiores para o alto N em relação ao baixo N. O genótipo que apresentou os maior teor de N para o nível alto N foi o RB855536 31,7 mg kg^{-1} por outro lado, o menor teor foi observado para o genótipo RB975242 20,0 mg kg^{-1}. Os índices SPAD também foram significativamente menores quando a dose baixo N foi utilizada.

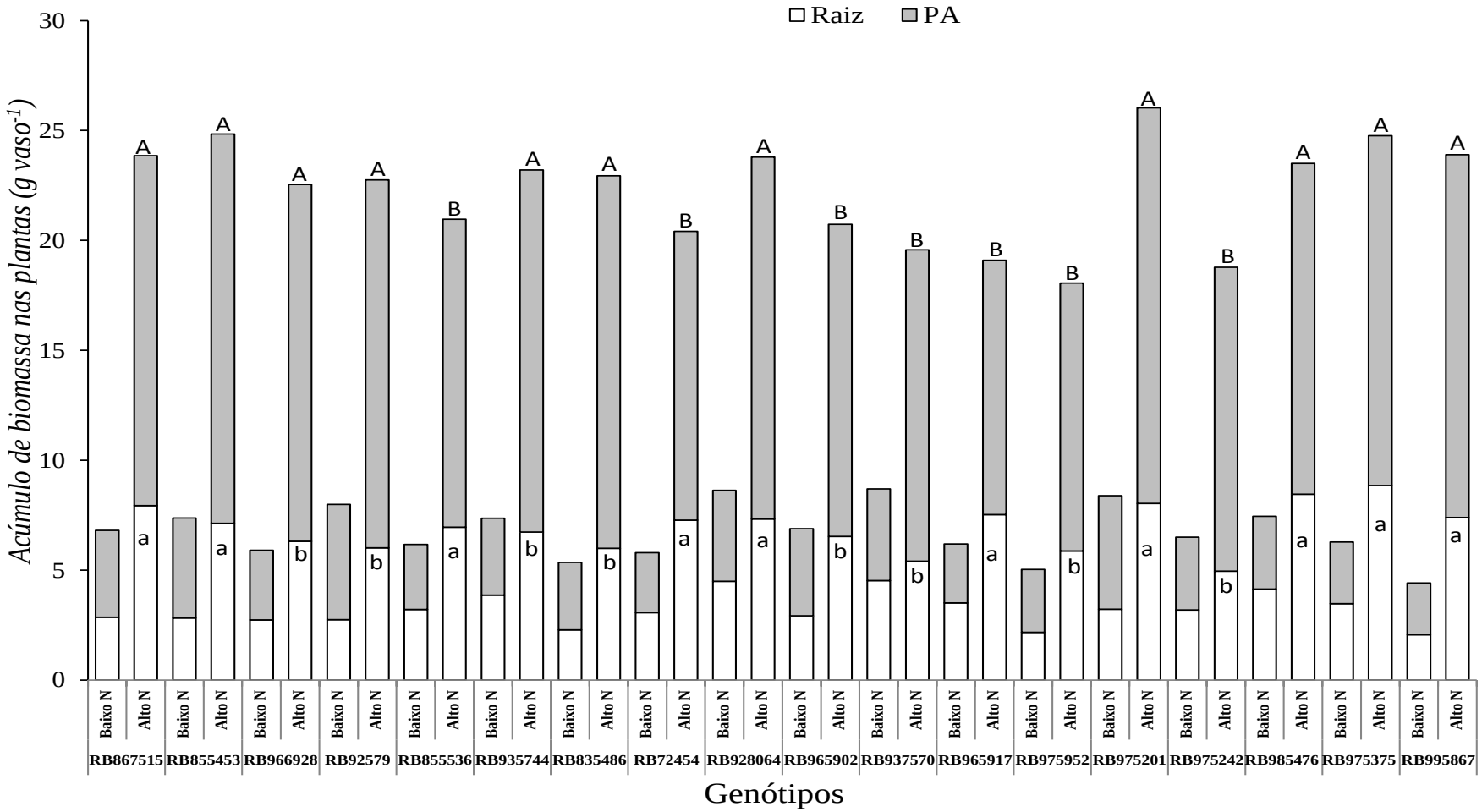


Figura 2.2. Acúmulo de massa seca na parte aérea (MSPA) e nas raízes (MSR) nos genótipos avaliados com dois níveis de N, sendo baixo N (10 mg kg^{-1}) e alto N (270 mg kg^{-1}). Coeficiente de variação de MSPA: 19,2, e de MSR: 30,3. Letras maiúsculas comparam os genótipos dentro de uma mesma dose no acúmulo de MSPA e letras minúsculas para MSR.

Tabela 2.3. Altura, diâmetro, índice SPAD e teor de N na folha+1 de 18 genótipos submetidos a duas doses de N: 10 mg N kg^{-1} (baixo N) e 270 mg kg^{-1} (alto N).

	Dose N	Altura cm	Diâmetro mm	SPAD	N folha+1 g kg^{-1}
RB867515		14,8	8,0	19,1	7,5
RB855453		14,3	8,5	21,9	6,7
RB966928		13,0	7,4	23,1	8,9
RB92579		16,0	8,3	15,2	6,8
RB855536		12,3	6,9	25,4	9,4
RB935744		15,8	7,9	20,0	7,9
RB835486		12,8	7,9	20,6	7,0
RB72454		13,8	6,5	21,9	10,3
RB928064	Baixo N	15,0	8,7	23,2	7,0
RB965902		14,3	8,2	19,5	6,4
RB937570		14,5	8,7	23,8	5,6
RB965917		11,8	7,7	26,0	6,9
RB975952		12,8	7,5	27,7	5,6
RB975201		16,0	9,0	20,4	8,0
RB975242		13,3	7,6	23,4	7,3
RB985476		12,5	9,4	23,8	6,2
RB975375		13,5	7,0	23,1	6,3
RB995867		11,5	6,8	24,7	9,4
RB867515		25,8 B	15,1 B	47,2 B	25,2 B
RB855453		28,8 A	16,7 A	52,9 A	27,2 A
RB966928		30,0 A	13,5 C	51,2 A	28,0 A
RB92579		30,5 A	13,5 C	40,9 B	27,1 A
RB855536		22,3 C	12,7 C	50,4 A	31,7 A
RB935744		33,3 A	14,4 B	50,1 A	29,4 A
RB835486		27,5 A	12,9 C	49,2 A	27,4 A
RB72454		29,0 A	13,1 C	48,1 A	27,1 A
RB928064	Alto N	26,8 B	13,9 B	52,6 A	25,0 B
RB965902		23,5 C	13,8 B	50,1 A	24,4 B
RB937570		26,3 B	14,2 B	55,0 B	22,7 C
RB965917		19,5 C	13,5 C	52,9 A	28,9 A
RB975952		29,8 A	11,5 C	54,2 A	29,4 A
RB975201		25,3 B	15,8 A	44,8 B	25,6 B
RB975242		24,3 A	14,3 B	49,0 A	20,0 C
RB985476		22,8 C	14,6 B	48,0 A	25,3 B
RB975375		24,8 B	10,7 C	53,3 A	24,1 B
RB995867		24,8 B	12,8 C	46,1 B	24,6 B
DMS		1,3	0,6	2,75	1,2
CV		11,9	11,6	15,4	14,6

DMS: diferença mínima significativa; CV: Coeficiente de variação;

Verificou-se uma grande diferença na EUN entre os genótipos, sendo que dos 18 genótipos testados seis foram classificados como responsivos e eficientes, três não eficientes e responsivos, dois eficientes e não responsivos, e sete não eficientes e não responsivos para a adubação nitrogenada (Figura 2.3). O genótipo que obteve a maior EUN, tanto para alto N como para baixo N, foi o RB975375. Por outro lado, o genótipo com o pior desempenho para os dois níveis de N foi o RB975201. Cabe ressaltar que entre os genótipos selecionados para a realização desse experimento, seis ainda não estavam disponíveis para os cultivos comerciais, sendo classificados como clones promissores. Assim como os dois acima citados com o melhor e o pior desempenho em ralação a EUN.

Por meio de análise de correlação de Pearson (Tabela 2.4) verificou-se que a EUN e o acúmulo de massa seca nas raízes estão correlacionados positivamente (r = 0,62 para baixo N e r = 0,53 para alto N), mostrando tendência entre essas variáveis. Por outro lado, a EUN correlacionou negativamente com o acúmulo de N tanto na parte aérea para baixo N (r=-0,75) como nas raízes (r=-0,73 em baixo N e r=-0,71 em alto N). Em baixo N as variáveis altura e diâmetro apresentaram correlação positiva com o acúmulo de MSPA (r=0,84 e r=0,72, respectivamente), enquanto que o índice SPAD apresentou correlação negativa com a MSPA para ambos os níveis (Tabela 2.4).

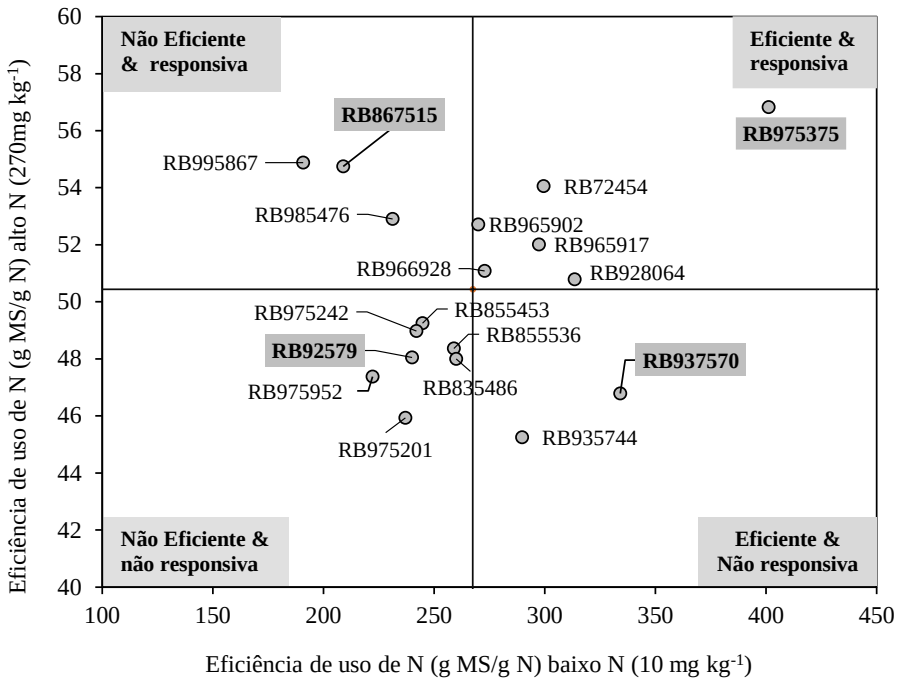


Figura 2.3. EUN para 18 genótipos de cana-de-açúcar divididos quanto a eficiência de uso de N e a resposta a suplementação de N quando submetidos a níveis de baixo N (10 mg kg^{-1}) e alto N (270 mg kg^{-1}). Genótipos hachurados foram selecionados para a realização da próxima etapa da tese (capítulo 3).

Tabela 2.4. Correlação de Pearson entre as variáveis avaliadas de planta em baixo (abaixo da diagonal principal) e alto N (acima da diagonal principal).

	MSPA	MSR	N PA	N raiz	EUN	Altura	Diâmetro	SPAD	Foto	N+1	EUNF
MSPA		0,23	-0,36	0,18	-0,25	0,38	0,42	-0,41	0,23	-0,11	-0,09
MSR	0,22		0,05	-0,31	0,53*	-0,33	0,02	-0,10	-0,19	0,11	-0,01
N PA	-0,38	-0,37		-0,49**	-0,08	0,11	-0,34	0,05	-0,06	0,72*	-0,44
N raiz	-0,32	-0,31	0,55*		-0,71**	0,18	0,34	-0,01	0,06	-0,09	0,12
EUN	0,01	0,62*	-0,75**	-0,73**		-0,51**	-0,29	0,15	-0,15	-0,23	0,17
Altura	0,84*	0,31	-0,55**	-0,18	0,14		0,05	-0,10	0,41	0,23	-0,39
Diâmetro	0,72*	0,48*	-0,09	-0,13	-0,02	0,48*		-0,22	0,36	-0,18	-0,08
SPAD	-0,67**	0,07	0,21	0,02	0,15	-0,74**	-0,29		0,29	0,06	-0,26
Foto	0,26	0,45	0,01	-0,16	0,08	0,16	0,23	-0,11		0,20	-0,79**
N+1	-0,32	-0,27	0,33	0,29	-0,31	-0,17	-0,61**	-0,02	0,15		-0,70**
EUNF	-0,07	-0,14	-0,28	-0,11	0,26	-0,06	0,09	0,18	-0,79**	-0,67**	

MSPA [g]; MSR [g]; N PA [g kg^{-1}]; N raiz [g kg^{-1}]; Eficiência; Altura [cm]; Diâmetro [mm]; SPAD; Fotossíntese [μmol m^{-2} s^{-1}]; N [g kg^{-1}]; Eficiência de Utilização de N na fotossíntese (EUNF) [μmol CO_2 mol N^{-1}]. *Significativo a 5 % de probabilidade variáveis correlacionadas positivamente; **Significativo a 5 % de probabilidade variáveis correlacionadas negativamente.

2.3.2. Variáveis fotossintéticas e N na folha+1

Os valores de assimilação líquida de CO_2 medidas no final do experimento diferiram para ambas as doses de N. Para alto N os genótipos foram divididos em cinco grupos, sendo que as taxas fotossintéticas maiores e menores foram obtidas nos genótipos RB855453 e RB995867 respectivamente (Figura 2.4). Em baixo N houve separação em apenas dois grupos estatisticamente diferentes. Com o suprimento limitante de N as médias da assimilação líquida de CO_2 foram menores que 9 μmol m^{-2} s^{-1} e em alto N as médias foram pelo menos 3 vezes superiores com valores acima de 35 μmol m^{-2} s^{-1}.

Os valores médios de N na folha+1 oscilaram entre 5,5 e 10,3 g kg^{-1} para baixo N e 19,9 e 31,6 g kg^{-1} para alto N. É possível verificar uma distinção bem clara entre o teor de N na folha +1 e a assimilação líquida de CO_2 para os níveis baixo e alto de nitrogênio, formando dois grupos específicos, verificou-se forte correlação entre a assimilação líquida (μmol m^{-2} s^{-1}) e teor de N na folha+1 (g kg^{-1}) com R^2=0,84 e *n*=144 (Figura 2.5). Utilizando os valores de assimilação de CO_2 e o teor de N, ambos quantificados na folha+1, calculou-se a eficiência de utilização de N na fotossíntese em μmol CO_2 mol N^{-1} (EUNF), a qual teve correlação negativa com o teor de N foliar (Figura 2.6), melhor ajustado com o nível baixo (R^2 = 0,58 e 0,39 para baixo e alto N, respectivamente).

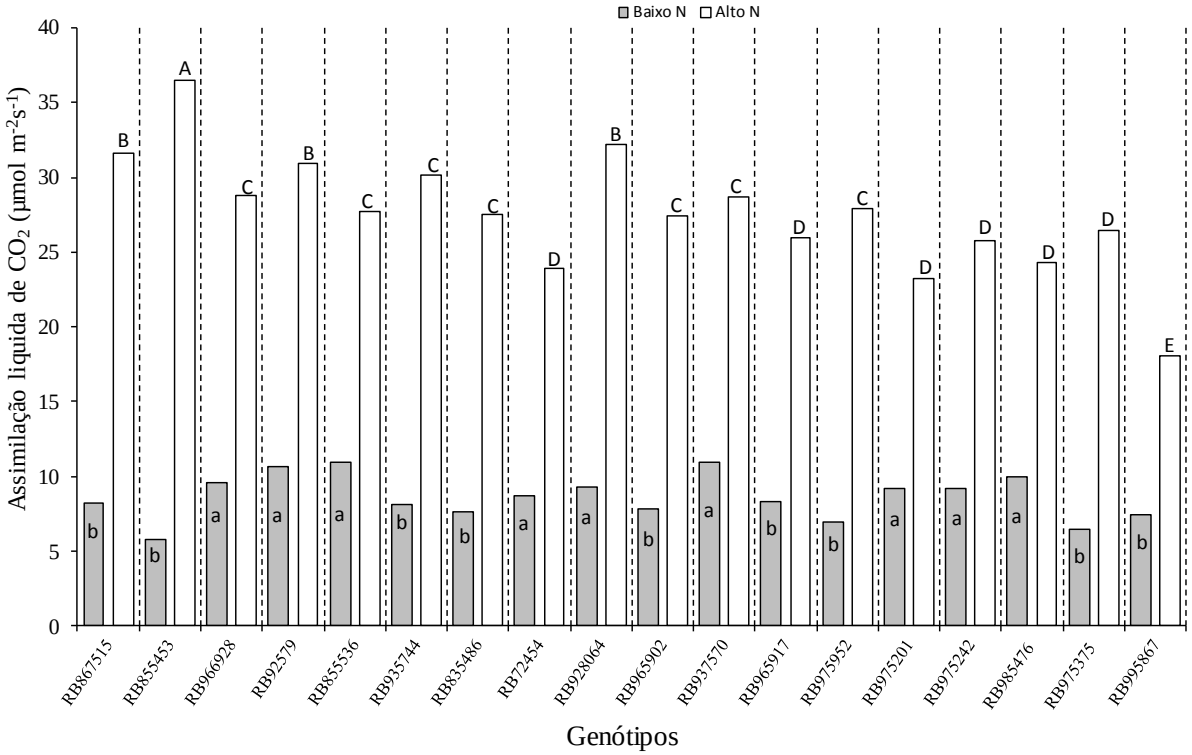


Figura 2.4. Assimilação líquida de CO_2 em µmol m^{-2} s^{-1} dos genótipos submetidos a duas doses de nitrogênio (10 mg kg^{-1} quando em baixo N e 270 mg kg^{-1} de N para a dose alto N). Letras maiúsculas comparam os genótipos para a dose alto N, e letras minúsculas comparam genótipos para a dose baixo N.

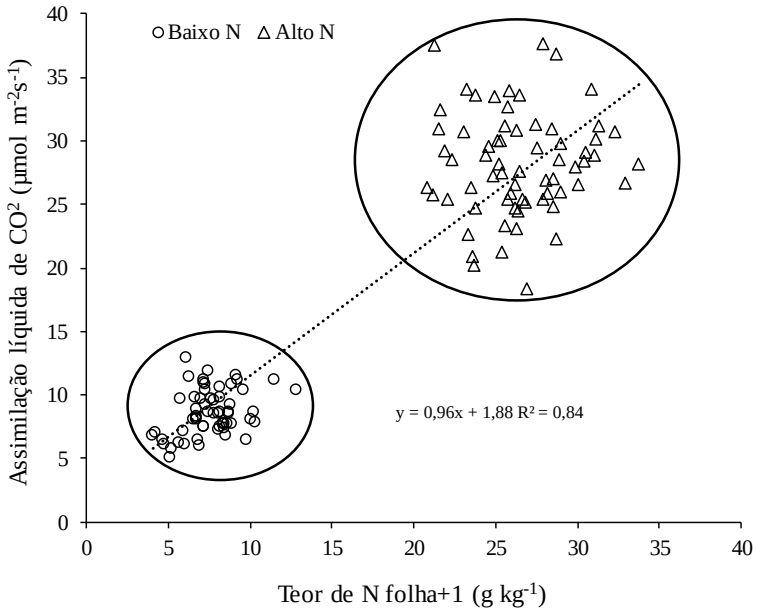


Figura 2.5. Relação entre teor de N e assimilação líquida de CO_2 analisadas na folha+1 para os 18 genótipos avaliados em 2 níveis de N (baixo e alto). (*n*=144).

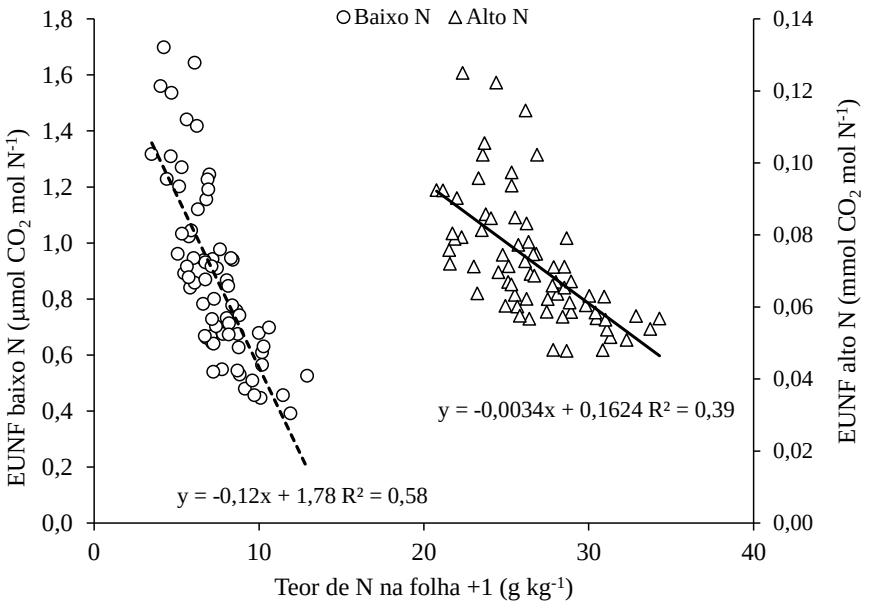


Figura 2.6. Eficiência de utilização de N na fotossíntese (EUNF) (µmol CO_2 mol N^{-1}) em função do teor de N na folha+1. Baixo N (10 mg kg^{-1}) e alto N (270 mg kg^{-1}). *n*=144.

2.3.3. Análise multivariada e componentes principais

O próximo passo, visando uma análise conjunta (multivariada) e mais robusta de todos os parâmetros avaliados, foi realizar a Análise de Componentes Principais (ACP). Antes de realizar a ACP procedeu-se a análise estatística descritiva das variáveis por meio das principais medidas de tendência central e dispersão para os níveis baixo e alto N nos 18 genótipos de cana-de-açúcar avaliados (Tabela 2.5). O maior coeficiente de variação foi verificado para a variável EUNF nos níveis Baixo e Alto N, sendo 28,8% e 23,9%, respectivamente. Não identificou-se nenhum genótipo com valores discrepantes para as variáveis analisadas que pudesse ser considerado "*outlier*". Para o nível baixo N a variável *EUNF* apresentou valores absolutos maiores e uma amplitude mais elevada quando comparado ao nível alto N, sendo esta amplitude igual a 196,43 e 12,49 para baixo e alto N respectivamente. As medidas de tendência central, média e mediana, foram muito próximas, indicando simetria na distribuição dos dados. Esta hipótese se confirma pelo teste Kolmogorov-Smirnov ($\alpha = 0,05$) que indica distribuição normal para todas as variáveis analisadas.

A análise de componentes principais (ACP) apresentou autovalores maiores que 1 (um) para os quatro primeiros componentes nos níveis baixo e alto N (Tabela 2.6), como proposto por Kaiser (1958), onde somente devem ser considerados os componentes com

autovalor acima de 1 por carregarem a maior parte das informações das variáveis originais. O conjunto dos quatro primeiros componentes principais explicam 87,7% e 79,0% da variância total dos dados para os níveis baixo e alto N, respectivamente. A porcentagem da variância total explicada pelo primeiro componente é maior para o nível baixo N (35,1%) quando comparado ao nível alto N (26,71%).

A correlação dos quatro primeiros componentes principais com as variáveis avaliadas (Tabela 2.7) mostram que o parâmetro *EUN* é melhor explicado pelo componente 2 para os nível baixo N ($\rho = 0,60$) e componente 1 para o nível alto N ($\rho = 0,74$). A projeção cartográfica das correlações apresentadas na Tabela 2.7 podem ser visualizadas na Figura 2.7 para os dois primeiros componentes principais.

Tabela 2.5. Estatística descritiva dos parâmetros avaliados nos níveis baixo e alto de N dos 18 genótipos de cana-de-açúcar.

		N	Média	Mediana	Min.	Max.	Variância	DP	CV	K-S
	MSPA	18	3,554	3,309	2,353	5,248	0,725	0,852	23,967	
	MSR	18	3,180	3,125	2,060	4,518	0,521	0,722	22,700	
	N PA	18	6,693	6,700	4,830	9,151	1,466	1,211	18,091	
	N raiz	18	5,018	4,763	2,910	7,233	1,454	1,206	24,028	
	EUN	18	269,348	258,998	204,774	401,204	2956,893	54,377	20,188	p-valor > .20
Baixo	**Altura**	18	13,750	13,625	11,500	16,000	1,971	1,404	10,209	
	Diâmetro	18	7,901	7,906	6,488	9,368	0,628	0,793	10,033	
	SPAD	18	22,361	23,075	15,175	27,725	8,647	2,941	13,150	
	Foto	18	8,645	8,532	5,800	10,962	2,226	1,492	17,257	
	N	18	7,399	6,963	5,568	10,300	1,825	1,351	18,260	
	EUNF	18	0,894	0,858	0,492	1,448	0,067	0,258	28,849	
	MSPA	18	15,281	15,916	11,570	17,998	3,434	1,853	12,127	
	MSR	18	6,926	7,039	4,958	8,845	1,102	1,050	15,154	
	N PA	18	30,873	30,434	26,060	34,101	4,623	2,150	6,965	
	N raiz	18	18,152	18,065	13,993	23,755	6,439	2,538	13,979	
	EUN	18	50,589	50,437	44,690	57,182	10,918	3,304	6,532	p-valor > .20
Alto	**Altura**	18	26,361	26,000	19,500	33,250	11,759	3,429	13,008	
	Diâmetro	18	13,722	13,665	10,748	16,685	2,000	1,414	10,307	
	SPAD	18	49,781	50,125	40,925	55,000	12,928	3,596	7,223	
	Foto	18	27,612	27,599	18,042	36,479	16,408	4,051	14,670	
	N+1	18	26,265	26,333	19,955	31,655	7,633	2,763	10,519	
	EUNF	18	0,074	0,068	0,052	0,115	0,000	0,018	23,893	

Min. – Mínimo; Max. – Máximo; DP – Desvio Padrão; CV – Coeficiente de Variação; K-S – Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov (α= 0,05). Unidades: PA [g]; Raiz [g]; N PA [g kg^{-1}]; N raiz [g kg^{-1}]; Eficiência; Altura [cm]; Diâmetro [mm]; SPAD; Foto [μmol m^{-2} s^{-1}]; N [g kg^{-1}]; EUNF [μmol CO_2 mol N^{-1}].

Tabela 2.6. Autovalores para os quatro primeiros Componentes Principais (CP) com a porcentagem da variância total explicada por cada componente (% Total) e o Acumulado (%) para os níveis Baixo e Alto N.

	CP	Autovalor	% Total	Acumulado (%)
Baixo	**1**	3,8	35,2	35,2
	2	2,5	22,7	57,9
	3	1,9	17,7	75,7
	4	1,3	12,0	87,7
Alto	**1**	2,9	26,7	26,7
	2	2,7	24,6	51,3
	3	1,6	14,9	66,2
	4	1,4	12,8	79,1

Tabela 2.7. Correlação entre os quatro primeiros Componentes Principais (CP) e as variáveis avaliadas para os níveis Baixo e Alto N.

	Baixo				**Alto**			
	CP 1	**CP 2**	**CP 3**	**CP4**	**CP 1**	**CP 2**	**CP 3**	**CP4**
MSPA	0,80	-0,44	0,30	-0,02	-0,39	0,47	-0,62	-0,22
MSR	0,61	0,07	-0,51	0,39	0,39	-0,17	-0,73	-0,11
N PA	-0,73	-0,36	0,13	0,44	-0,11	-0,83	0,11	-0,41
N raiz	-0,60	-0,36	0,36	0,20	-0,44	0,62	0,37	0,02
EUN	0,56	***0,60***	-0,50	-0,18	***0,74***	-0,29	-0,41	0,33
Altura	0,78	-0,39	0,24	-0,28	-0,74	0,00	0,03	-0,20
Diâmetro	0,67	-0,23	0,29	0,61	-0,38	0,52	-0,39	0,15
SPAD	-0,46	0,58	-0,37	0,40	-0,01	-0,36	0,31	0,75
Foto	0,26	-0,56	-0,66	0,25	-0,71	-0,15	-0,29	0,56
N+1	-0,55	-0,47	-0,38	-0,46	-0,44	-0,72	-0,02	-0,31
EUNF	0,13	0,78	0,59	0,02	0,70	0,60	0,27	-0,21

A análise da correlação das variáveis com os componentes principais, por meio da projeção cartográfica, permite inferir quais variáveis estão diretamente correlacionadas (vetores na mesma direção – ≈ 0°), inversamente correlacionadas (vetores em direções opostas – ≈ 180°) e não correlacionadas (vetores perpendiculares – ≈ 90°). Tal fato mostra que a variável *EUN* apresenta tendência de correlação com a variável MSR, estando estas diretamente correlacionadas tanto para o nível baixo N quanto para o nível alto N, confirmando os coeficientes de correlação de Pearson (r = 0,62 e 0,53, para os níveis baixo e alto, respectivamente). Tal fato colabora para mostrar que a quantidade de raiz presente na planta pode influenciar diretamente a eficiência dos genótipos na utilização do nitrogênio disponível. O nitrogênio acumulado na raiz (N raiz) também apresenta uma correlação significativa (p =

0,05) com a variável *EUN*, sendo inversamente proporcional a esta (vetores opostos Figura 2.7), isto é, quanto maior a EUN do genótipo (conversão em biomassa) menor será o acumulo de nitrogênio na raiz, sendo *r* = -0,73 e -0,71 para os níveis Baixo e Alto N, respectivamente, segundo Tabela 2.4.

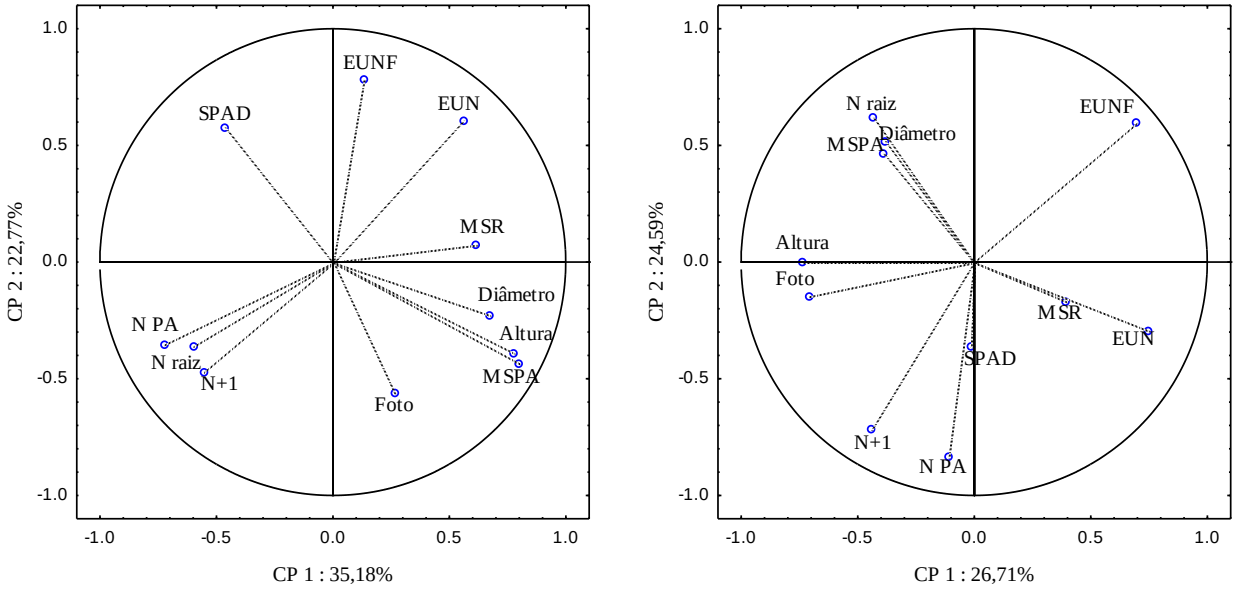


Figura 2.7. Projeção Cartográfica Unitária das variáveis avaliadas para os Componentes Principais 1 (eixo x) e 2 (eixo y) nos níveis Baixo (esquerda) e Alto (direita) de N.

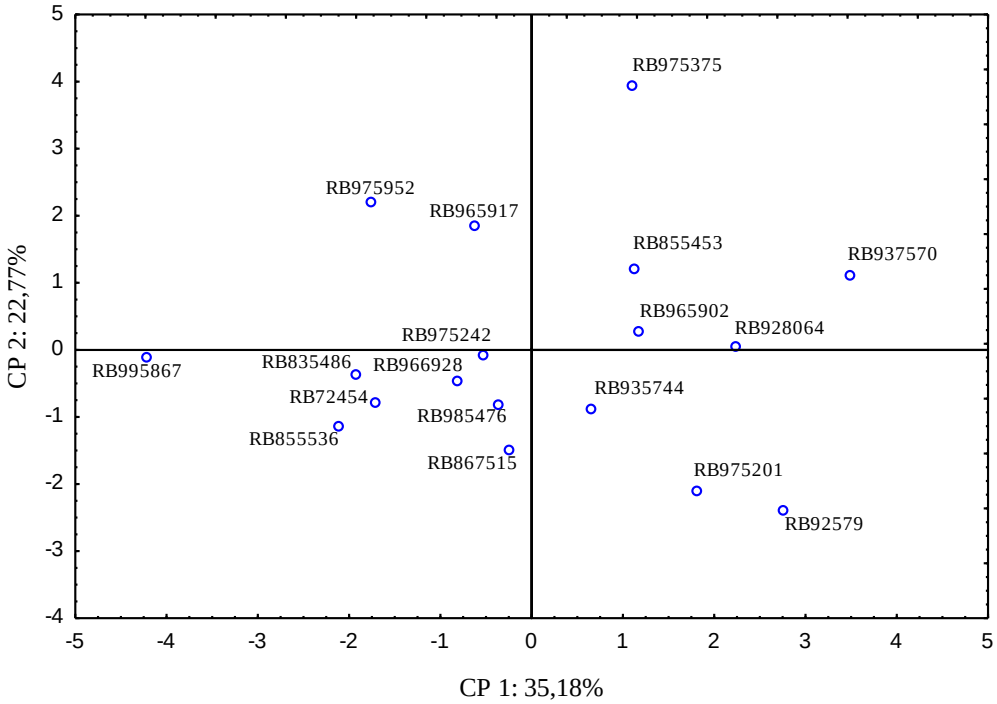
Sendo os dois primeiros componentes principais, tanto para os níveis baixo e alto N, responsáveis por explicar a maior parte da variabilidade dos dados e estarem correlacionadas diretamente com a variável *EUN*, a análise dos fatores de correlação destes componentes com os genótipos testados permite inferir quais destes expressam melhor esta variável (Tabela 2.8). Desta forma, a projeção cartográfica dos fatores de cada genótipo, tanto para os níveis baixo e alto N, permite verificar os melhores e os piores genótipos de cana-de-açúcar do ponto de vista da EUN e a correlação destes genótipos com os demais parâmetros avaliados (Figura 2.8). Os genótipos localizados no quadrante I para o nível baixo (RB928064, RB965902, RB937570, RB855453 e RB975375) e no quadrante IV para o nível alto (RB72454, RB965902, RB965917 e RB975375), representam os que refletem melhor a variável *EUN*. Dentre estes genótipos, o RB975375 é o único que apresenta correlação direta com a EUN tanto para o nível baixo quanto alto de N. Entre os genótipos menos eficientes (localizados na direção oposta do vetor EUN), o genótipo RB835486 é o único que apresenta baixa eficiência tanto para baixo como alto N. Os demais genótipos apresentam comportamentos distintos quando na presença dos dois (baixo e alto) diferentes níveis de N avaliados.

Tabela 2.8. Fatores, baseados na correlação com os componentes, dos 18 genótipos de cana-de-açúcar avaliados nos níveis baixo e alto de N para os Componentes Principais 1 e 2.

	Baixo		**Alto**	
	CP 1	**CP 2**	**CP 1**	**CP 2**
RB867515	-0,24	-1,49	-0,18	-0,26
RB855453	1,11	1,22	-2,48	0,68
RB966928	-0,82	-0,48	-0,93	-1,79
RB92579	2,76	-2,40	-1,72	0,34
RB855536	-2,12	-1,12	-0,59	-2,02
RB935744	0,64	-0,88	-3,41	0,76
RB835486	-1,92	-0,37	-0,82	0,13
RB72454	-1,72	-0,79	0,96	-1,58
RB928064	2,23	0,05	-0,68	0,02
RB965902	1,16	0,27	1,34	-0,45
RB937570	3,49	1,12	-0,63	1,26
RB965917	-0,62	1,85	1,88	-2,20
RB975952	-1,76	2,20	-0,84	-2,42
RB975201	1,80	-2,10	-0,43	2,32
RB975242	-0,52	-0,08	1,26	3,71
RB985476	-0,36	-0,81	2,15	0,63
RB975375	1,10	3,93	2,62	-0,70
RB995867	-4,22	-0,11	2,49	1,58

Devido ao comportamento distinto, em termos de EUN, da maioria dos genótipos avaliados na presença dos níveis baixo e alto de nitrogênio, é possível realizar a mesma análise proposta por Robinson et al. (2007) para encontrar os genótipos mais eficientes e responsivos por meio dos componentes principais. No entanto, a diferença é que ao invés de se utilizar a média de EUN da amostra, propõe-se aqui utilizar os componentes principais que representam melhor a EUN, sendo os componentes 2 e 1 para o nível baixo e alto, respectivamente, como apresentado anteriormente (Tabela 2.7). A vantagem desta análise é que, além de representarem a EUN, os componentes carregam em si os demais parâmetros avaliados, tornando a análise mais robusta. Desta forma, para refinar o resultado na busca dos genótipos mais eficientes, fez-se a projeção cartográfica dos fatores dos genótipos (Tabela 2.8) do componente principal 2 para o nível baixo (eixo x) e do componente principal 1 para o nível alto (eixo y) (Figura 2.9). Esta análise permite classificar os genótipos em quatro classes distintas, sendo elas:

- Classe 1: (+) Eficiente / (+) Responsivo (Quadrante I);
- Classe 2: (−) Eficiente / (+) Responsivo (Quadrante II);
- Classe 3: (−) Eficiente / (−) Responsivo (Quadrante III);
- Classe 4:(+) Eficiente / (−) Responsivo (Quadrante IV).



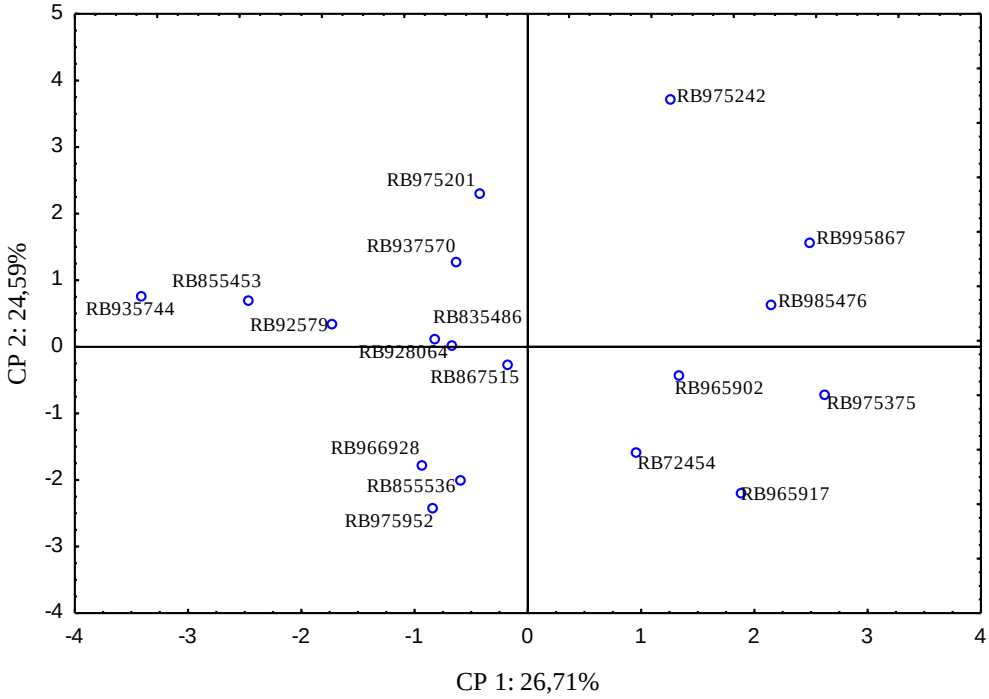


Figura 2.8 Projeção cartográfica dos fatores, baseados na correlação com os componentes, para os genótipos de cana-de-açúcar avaliados. Níveis baixo (acima) e alto (abaixo) de nitrogênio para os componentes principais 1 (eixo x) e 2 (eixo y).

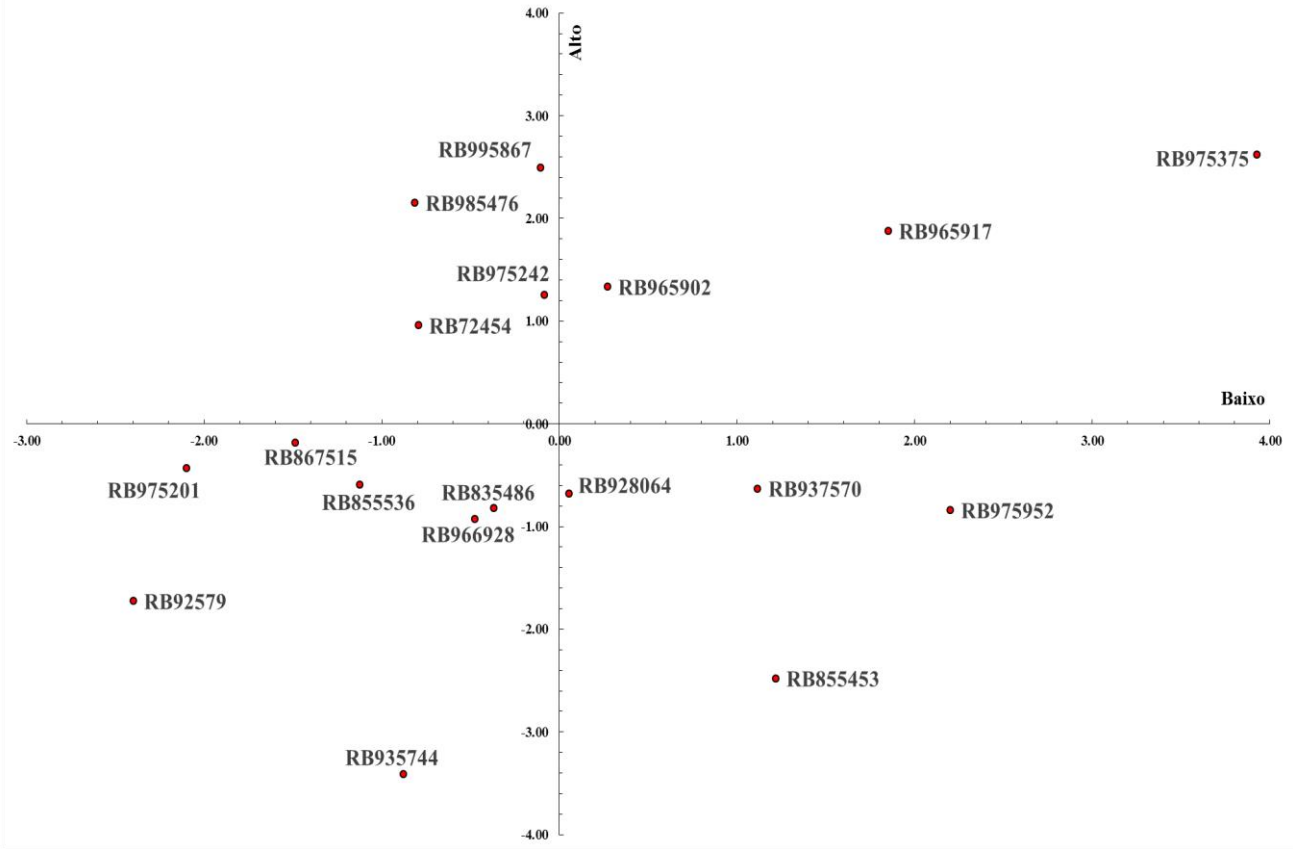


Figura 2.9 Projeção cartográfica dos fatores para os genótipos avaliados (Tabela 4) do componente principal 2 para o nível Baixo (eixo x) e do componente principal 1 para o nível Alto (eixo y).

2.4 Discussão

Este estudo teve como objetivo inicial caracterizar, em condições controladas, 18 genótipos de cana-de-açúcar em relação à eficiência de utilização de nitrogênio, utilizando-se para isso de duas doses, uma limitante e outra alta. No entanto, sugere-se estudos complementares em campo para validar os resultados apresentados e discutidos aqui.

Nas condições controladas do experimento é possível observar diferenças entre os 18 genótipos avaliados para as doses aplicadas, sendo tal fato verificado pela alta variação na produção de biomassa. Para a dose baixa de N a diferença entre a maior e a menor produção de biomassa foi de aproximadamente 2,2 vezes, enquanto que para a dose alta essa foi de 1,5 vezes. A dose alta de N produziu em média, aproximadamente, 5 vezes mais MSPA do que para a dose baixa, sendo a (MSR) o dobro para a dose alta em comparação à dose baixa. Tal fato evidencia que os genótipos selecionados apresentam alta variabilidade de produção, indicando

ser uma amostra representativa para a avaliação de eficiência em utilização de Nitrogênio. Resultados semelhantes foram obtidos por Robinson et al. (2007), que avaliaram cerca de 60 genótipos de cana-de-açúcar na Austrália. Os autores obtiveram uma variação ainda maior, chegando a quatro vezes a diferença na produção de biomassa. No presente trabalho, dentre os genótipos que se destacaram para a produção de biomassa, quatro deles (RB975201, RB995867, RB975375, RB985476) ainda não estavam disponíveis comercialmente. Esse fato mostra o elevado potencial de novos genótipos que estão sendo desenvolvidos com a possibilidade de associar a esses novos lançamentos a informação quanto a EUN. A realização de experimentos em campo e até mesmo casa de vegetação são necessários para pesquisar e desenvolver genótipos, melhorando assim a sustentabilidade de uso de nitrogênio na produção de cana-de-açúcar.

Analisando a Figura 2.9 é possível concluir que os melhores genótipos, isto é, mais eficientes e responsivos (Classe 1) são: RB975375, RB965917 e RB965902; sendo que estes genótipos também se destacaram na produção de MSR. Por outro lado, os piores genótipos (Classe 3) são: RB835486, RB966928, RB935744, RB855536, RB867515, RB975201 e RB92579.

Comparando-se a análise por meio da média das amostras (Robinson et al., 2007) e a análise proposta aqui (por meio dos componentes principais), é possível afirmar que a análise de CP foi mais restritiva na classificação dos melhores genótipos (eficientes e responsivos), apresentando metade dos genótipos (apenas três) em comparação a metodologia pela média. Todos os genótipos classificados como eficientes e responsivos na ACP (RB985375, RB965917 e RB965902) também ficaram na mesma classe de eficiência pela análise de médias, sendo que o genótipo RB965902 ficou no limiar entre as classes 1 e 2 por meio desta análise. Os genótipos RB72454, RB928064 e RB966928, pertencentes a classe 1 pela análise da média, passaram a ser classificados como (−) Eficiente / (+) Responsivo (genótipo RB72454), (+) Eficiente / (−) Responsivo (genótipo RB928064) e (−) Eficiente / (−) Responsivo (genótipo RB966928). Entre os menos eficientes e responsivos (classe 3), os genótipos RB855536, RB835486, RB92579 e RB975201 foram classificados nesta classe por meio das duas análises. Os genótipos que representam melhor cada classe de eficiência, para ambas as análises, levando-se em consideração à distância de cruzamento dos eixos (x=y=zero) foram:

Classe 1: Pela Média – RB975375 / Pela ACP – RB975375;

Classe 2: Pela Média – RB995867 / Pela ACP – RB985476;

Classe 3: Pela Média – RB975201 / Pela ACP – RB92579;

Classe 4: Pela Média – RB937570 / Pela ACP – RB975952.

Em relação a EUN, o genótipo que apresentou grande destaque foi o RB975375 (Figura 2.3 e 2.9). Esse genótipo foi altamente eficiente quando o N estava limitante no substrato (baixo N) e apresentou elevada resposta quando utilizou-se dose elevada de N (alto N). Embora muitos estudos em outras culturas já identificaram uma variação genotípica de EUN, como milho de clima temperado, (BERTIN; GALLAIS, 2000); milho tropical (BÄNZIGER et al., 1997); cevada (SINEBO et al., 2004); trigo (LE GOUIS et al., 2000); arroz (SAMONTE et al., 2006), a importância da interação do genótipo e do suprimento de N ainda não é clara, e isso tem implicações significativas para estratégias de seleção de cultivares. Presterl et al. (2002) verificaram que genótipos de milho selecionados no campo com baixa oferta de N, tinham significativamente rendimentos mais elevados com baixa e alta oferta N do que aqueles que foram selecionados sob elevada oferta de N. Esse fato ocorreu devido há um aumento da eficiência de absorção de N. Esses autores sugeriram que genótipos de milho europeu deveriam ser selecionados com uma baixa oferta de N, e que isso não afetaria o rendimento quando submetidos a uma grande oferta de N. Nesse caso, considerando as áreas de expansão da cana-de-açúcar no Brasil que geralmente ocorrem em áreas de menor fertilidade, seria mais prudente a seleção de genótipos que apresentem elevada EUN com dose baixa de N, possibilitando a utilização desses em condições de maior e menor disponibilidade de nutriente sem afetar os níveis de produtividade.

Dos oito genótipos que foram considerados eficientes na utilização do N com suprimento limitado de N, apenas dois não foram classificados como responsivos a dose elevada de N RB935744 e RB937570, esses mesmos genótipos tiveram menor produção de MSR e baixa assimilação de CO_2 quando cresceram bem supridos de N. Nesse estudo, somente quatro genótipos dos oito considerados eficientes com baixo N apresentaram produção de MSPA e MSR elevada. Esses resultados discordam dos obtidos por Robinson et al. (2007), a qual verificou que os genótipos com as maiores EUN também tiveram maior produção de biomassa.

Observando os valores de assimilação líquida verificou-se que os genótipos que apresentaram melhores desempenho nesse parâmetro não foram os mais eficientes na utilização do N, como por exemplo o RB975375 que se destacou na EUN, apresentando o segundo pior desempenho em relação a assimilação (Figura 2.4). Uma explicação para esses resultados está associada a quantidade de raízes produzida. Uma vez que, a EUN está diretamente relacionada a produção de MSR (Figura 2.7) fica evidente que esse é o principal responsável pelas maiores EUN. O genótipo RB975375 apresentou a maior produção de MSR para Alto N e a terceira

maior produção de MSR para baixo N, consequentemente teve os melhores desempenhos quanto a EUN.

Houve uma drástica queda na assimilação líquida de CO_2 quando o N estava limitante para as plantas, com valores cerca de três vezes menores (Figura 2.4). Isso era esperado pois aproximadamente 40-50% do N em folhas de plantas C4 é utilizado pelas enzimas fotossintéticas como RUBISCO e PEP-case (LAWLOR, 1987). Uma forte correlação entre teor de N folha e a assimilação líquida de CO_2 também foi verificada em trabalho realizado por Meinzer e Zhu, (1998) utilizando quatro espécies de cana-de-açúcar e quatro genótipos comerciais do Hawai, EUA.

EUNF mede a taxa máxima fotossintética das folhas em relação aos níveis de N da folha e, portanto, é um indicador da eficiência da quantidade de N necessária por unidade de CO_2 fixada. EUNF poderia representar uma ferramenta de seleção para EUN de genótipos para os programas de melhoramento. Os valores de EUNF obtidos estão próximos dos obtidos por Meinzer e Zhu, (1998). No entanto, neste trabalho os genótipos apresentaram uma variabilidade alta na mesma dose de N, sendo ainda significativo $p<0,05$ uma correlação com o teor de N na folha +1 com um R^2 0,58 e 0,39 para baixo e alto N respectivamente (Figura 2.6). A absorção e assimilação de formas orgânicas e inorgânicas de N do solo pelas plantas, e o transporte do N assimilado para novos órgãos, são partes essenciais para o desenvolvimento e o crescimento vegetal (RENTSCHER et al., 2007). Assim, mesmo existindo o efeito diluição em cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2013), ou seja com o aumento da massa da planta há uma diminuição dos teores de N, nesse trabalho foi observado que os valores de N na folha+1 foram bastante distintos entre as doses de baixo e alto N.

2.5 Conclusões

Os genótipos avaliados apresentaram grandes contrastes em relação a resposta e a eficiência de utilização do N, sendo que esse resultado preliminar comprova, em parte, que a recomendação de adubação atualmente utilizada, sem considerar a eficiência de utilização dos nutrientes nesse caso o N, pode estar equivocada.

As medições de assimilação líquidas de CO_2 mostraram que os genótipos mais eficientes na utilização do N, não necessariamente possuem as taxas fotossintéticas mais elevadas, e que nesse estudo a EUN está diretamente relacionada a quantidade de raízes das plantas.

Com auxílio da análise multivariada de componentes principais CP foi possível identificar que a produção de raízes é o principal responsável pela elevada EUN obtida por alguns genótipos, por outro lado, a assimilação líquida de CO_2 está pouco relacionada com a EUN.

Referências

ALLEN, D. E.; KINGSTON, G.; RENNENBERG, H.; DALAL, R. C.; SCHMIDT, S. Effect of nitrogen fertilizer management and waterlogging on nitrous oxide emission from subtropical sugarcane soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment,** Amsterdam, v. 136, p. 209–217, 2012.

AMARAL, L. R.; MOLIN, J.P.; SCHEPERS, J. S. Algorithm for Variable-Rate Nitrogen Application in Sugarcane Based On Active Crop Canopy Sensor. **Agronomy Journal**, Madison, v. 107, p. 1-17, 2015.

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

AZEREDO, D. F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H.; VIEIRA, J. R. Nitrogênio em cana planta – doses e fracionamento. **STAB. Açúcar, Álcool e Subprosutos,** Piracicaba, v. 6, p. 26-33, 1986.

BÄNZIGER, M.; BETRAN, F. J.; LAFITTE, H. R. Efficiency of high-N selection environments for improving maize for low-N target environments. **Crop Science,** Madison, v. 37, p. 1103–1109, 1997.

BEATTY, P. H.; ANBESSA, Y.; JUSKIW, P.; CARROLL, R. T.; WANG, J.; GOOD, A. G. Nitrogen use efficiencies of spring barley grown under varying nitrogen conditions in the field and growth chamber. **Annals of Botany,** Oxford, v. 105, p. 1171–1182, 2010.

BERTIN, P.; GALLAIS, A. Genetic variation for nitrogen use efficiency in a set of recombinant maize inbred lines. I. Agrophysiological results. **Maydica,** Bergano, 45, 53–66, 2000.

BRAUER, E. K.; SHELP, B. J. Nitrogen use efficiency: re-consideration of the bioengineering approach. **Botany,** Ottawa, v. 88, p. 103–109, 2002.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants**: principles and perspectives. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 400 p.

FAGUERIA, N. K.; BELIGAR, V. C. Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. **Advances in Agronomy,** San Diego, v. 85, p. 97-185, 2005.

FORTES, C.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. Long Term decomposition of sugarcane harvest residues in Sao Paulo State Brazil. **Biomass & Bioenergy,** Oxford, v. 42, p. 189-198, 2012.

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 in Brazilian field conditions. **Field Crops Research,** Amsterdam, v. 121, p. 29-41, 2011.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Stalk yield and technological attributes of planted cane as related to nitrogen fertilization. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 67, p. 579–590, 2010.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. esp., p. 2763-2770, 2008.

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

HAJARI, E.; SANDY J. S.; WATT, M. P. Nitrogen use efficiency of sugarcane (Saccharum spp.) varieties under in vitro conditions with varied N supply. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture,** The Hague, v.122, p. 21–29, 2015.

HIREL, B.; Le GOUIS, J.; NEY, B; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 58, p. 2369-2387, 2007.

HIROSE, T. Leaf-level nitrogen use efficiency: definition and importance, **Oecologia,** Berlin, v. 169, p. 591–597, 2012.

LE GOUIS, J. B.; EGHIN, B.; HEUMEZ, E.; PLUCHARD, P. Genetic differences for nitrogen uptake and nitrogen utilisation efficiencies in winter wheat. **European Journal of Agronomy,** Oxford, v. 12, p. 163–173, 2000.

MARIANO, E.; LEITE, J. M.; MEGDA, M. X. V.; TORRES-DORANTE, L.; TRIVELIN, P. C. O. Influence of nitrogen form supply on soil mineral nitrogen dynamics, nitrogen uptake, and productivity of sugarcane. **Agronomy Journal,** Madison, v. 107, p. 641-650, 2015.

MEINZER, F. C.; ZHU, J. Nitrogen stress reduces the efficiency of the C_4CO_2 concentrating system, and therefore quantum yield, in Saccharum (sugarcane) species. **Journal Experimental Botany,** Oxford, v. 49, p. 1227-1234, 1998.

MEGDA, M. X. V.; TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; VITTI, A.C. Eficiência agronômica de adubos nitrogenados em soqueira de cana-de-açúcar colhida sem queima. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 47, p. 1681-1690, 2012.

MOOSE, S. BELOW, F. E. Biotechnology approaches to improving maize nitrogen use efficiency. In: KRIZ, A. L.; LARKINS, B. A. (Ed.). **Molecular genetics approaches to maize improvement**. Heidelberg: Springer, 2009. P. 65–77. (Biotechnology in Agriculture and Forestry, 63).

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Determination of total nitrogen in plant material. **Agronomy Journal,** Madison, v. 65, p. 109-112, 1973.

POORTER, H.; FIORANI, F.; STITT, M.; SCHURR, U.; FINCK, A.; GIBON, Y.; USADEL, B.; MUNNS, R.; ATKIN, O. K.; TARDIEU, F.; PONS, T. L. The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v. 39, p. 821–838, 2012.

PORTZ, G.; MOLIN, J. P.; JASPER, J. Active crop sensor to detect variability of nitrogen supply and biomass on sugarcane fields. **Precision Agriculture,** New York, v. 13, p. 33-44, 2012.

PRASERTSAK, P.; FRENEY, J. R.; DENMEAD, O. T.; SAFFIGNA, P. G.; PROVE, B. G.; REGHENZANI, J. R. Effects of fertilizer placement on nitrogen loss from sugarcane in tropical Queensland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems,** Heidelberg, v. 62, p. 229-239, 2002.

PRESTERL, T.; GROH, S.; LANDBECK, M.; SEITZ, G.; SCHMIDT, W.; GEIGER, H. H. Nitrogen uptake and utilization efficiency of European maize hybrids developed under conditions of low and high nitrogen input. **Plant Breeding,** Berlin, v. 121, p. 480–486, 2002.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas.** Lavras: UFLA, 2000. p. 87-134.

RANJITH, S. A.; MEIZER, F. C.; PERRY, M. H.; THOM, M. Partitioning of carboxylase activity in nitrogen-stressed sugarcane and its relationship to bundle sheath leakiness to CO2, photosynthesis and carbon isotope discrimination. **Australian Journal of plant Physiology,** Melbourne, v. 22, p. 903-911, 1995.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; SOPER, K. V. F.; GAMAGE, J. H. H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PloS One,** San Francisco, v. 6, n. 4, e19045, 2011.

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

ROBINSON, N.; FLETCHER, A.; WHAN, A.; VINALL, K.; BRACKIN, R.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Sustainable sugarcane production systems: reducing plant nitrogen demand. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technology,** Brisbane, v. 30, p. 212-219, 2008.

ROSA, H. J. A.; AMARAL, L. R.; MOLIN, J. P.; CANTARELLA, H. Sugarcane response to nitrogen rates, measured by a canopy reflectance sensor. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasilia, DF, v. 50, p. 840-848, 2015.

SAMONTE, S. O. P. B.; SAMONTE, P. B.; WILSON, L. T.; MEDLEY, J. C.; PINSON, S.; MCCLUNG, A. M.; LALES, J. S. Nitrogen utilization efficiency: relationships with grain yield, grain protein, and yield-related traits in rice. **Agronomy Journal**, Madison, v. 98, p. 168–176, 2006.

SCHUMANN, A. W.; MEYER, J. H.; NAIR, D. Evidence for different nitrogen use efficiencies of selected sugarcane varieties. **Proceedings South Africa Sugar Technology Association,** Ethekwini, v. 72, p. 72–80, 1998.

SINEBO, W.; GRETZMACHERB, R.; EDELBAUER, A. Genotypic variation for nitrogen use efficiency in Ethiopian barley. **Field Crops Research,** Amsterdam, v. 85, p. 43–60, 2004.

SYLVESTER-BRADDLEY, R.; KINDRED, D. R. Analyzing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 60, p. 1939-1951, 2009.

THORBURN, P. J.; BIGGS, J. S.; WEBSTER, S. J.; BIGGS, I. M. An improved way to determine nitrogen fertiliser requirements of sugarcane crops to meet global environmental challenges. **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 339, p. 51-67, 2011.

TRIVELIN, P. C. O. **Utilização do nitrogênio pela cana-de-açúcar**: três casos estudados com uso do traçador ^{15}N. 2000. 143 p. Tese (Livre-Docência) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

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

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

VIEIRA, M. X.; TRIVELIN, P. O.; FRANCO, H. C. J.; OTTO, R.; FARONI, C. E. Ammonium chloride as nitrogen source in sugarcane harvested without burning. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 34, p. 1165-1174, 2010.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 46, p. 287-293, 2011.

VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; FRANCO, H. C. J.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E. Produtividade da cana-de-açúcar relacionada à localização de adubos nitrogenados aplicados sobre os resíduos culturais em canavial sem queima. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 31, p. 491-498, 2007.

WEIGEL, A.; MEYER, J. H.; MOODLEY, S. Nitrogen responses and nitrogen use efficiency of four sugarcane varieties in Mpumalanga. **Proceedings South Africa Sugar Technology Association,** Ethekwini, v. 83, p. 216–220, 2010.

WEIGEL, A.; MILES, N. Towards a more accurate prediction of nitrogen reserves in the soil for crop growth. **Proceedings South Africa Sugar Technology Association,** Ethekwini, v. 86, p. 141–144, 2013.

WHAN, A.; ROBINSON, N.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S.; & AITKEN, K. A quantitative genetics approach to nitrogen use efficiency in sugarcane. **Functional Plant Biology,** Collingwood v. 37, p. 448-454, 2010.

3 PREFERÊNCIA DE ABSORÇÃO DE AMÔNIO POR GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR CONTRASTANTES EM EUN E ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE N

Resumo

O Brasil é um grande consumidor de nitrogênio, sendo muito dependente de importações desse nutriente. Além disso, a eficiência de utilização de N é muito baixa no país, principalmente em cana-de-açúcar. Existem dados na literatura que indicam que a cana-de-açúcar tem preferência pela absorção do amônio ao invés de nitrato. Portanto, adubação com fontes amoniacais têm o potencial de aumentar a eficiência de utilização de N (EUN) pela cultura. O objetivo desse estudo foi verificar a preferência de absorção por amônio em relação ao nitrato em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes em EUN, correlacionando com as atividades das enzimas do metabolismo primário do N. Para tanto, desenvolveu-se um experimento em câmara de crescimento (Fitotron), com 4 genótipos, previamente selecionados quanto a EUN, sendo avaliados em três tempos: 0, 24 e 72 horas após a aplicação dos fertilizantes marcados. O experimento foi planejado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Utilizaram-se duas fontes de N, em ambos tratamentos, com marcações ora no $^{15}NH_4^+$, ora no $^{15}NO_3^-$. O acúmulo de massa seca na parte aérea e raízes e a quantidade de N proveniente do fertilizante foram avaliados, assim como a atividade máxima das enzimas redutase nitrato (RN) e glutamina sintetase (GS). As concentrações de N-NH_4^+ no solo decaíram em maior proporção em relação ao N-NO_3^- entre os tempos de avaliações *T24* e *T72*. Não houve diferenças nas abundâncias entre as fontes de ^{15}N aplicadas NH_4^+ e NO_3^-, porém houve um aumento gradativo entre os tempos para folhas, caules e raízes. Os acúmulos de N na planta proveniente do fertilizante (NPPF) na média dos quatro genótipos, 72 horas após a aplicação do N, foram 31 e 42% menores na fonte NO_3^- para raízes e parte aérea, respectivamente. Esses números confirmam que a cana-de-açúcar tem preferência na absorção por amônio em relação a nitrato nos primeiros dias após a adubação. Verificou-se que 11% de todo N presente na raiz era proveniente do N aplicado da fonte NH_4^+ e 7,2% da fonte NO_3^- em *T72*. Na parte aérea os valores percentuais do N proveniente do adubo presentes na planta foram menores, cerca de 8% para a fonte NH_4^+ e 5% para o NO_3^-. As enzimas do metabolismo primário de N, RN e GS, tiveram atividades máximas similares para os quatro genótipos, ocorrendo aumento linear entre os tempos para a GS, para RN um aumento em T0 para *T24* com posterior declínio em *T72*. Os quatro genótipos apresentaram preferência de absorção por amônio em *T72*, porém sem diferenças entre os genótipos tidos como eficientes e não eficientes.

Palavras-chave: glutamina sintetase, redutase do nitrato, nitrato, ^{15}N

AMMONIUM UPTAKE PREFERENCE IN SUGARCANE GENOTYPES CONTRASTING FOR NUE AND ACTIVITY OF N METABOLYZING ENZYMES

Abstract

Brazil is a great N consumer as is very dependent on the importation of this nutrient. In addition, N utilization efficiency in the country is very low, especially in sugarcane. Data from the literature indicate that sugarcane has a preference for ammonium uptake in comparison to nitrate. Therefore, fertilization with ammoniacal N sources has the potential to increase N use efficiency (NUE) in this crop. The aim of this study was to evaluate the preference for ammonium uptake in relation to nitrate in sugarcane genotypes contrasting for NUE, and correlate it with the activity of enzymes of primary N metabolism. For this, an experiment was performed in controlled growth chambers (Fitotron), using 4 pre-selected genotypes contrasting for NUE, evaluated in different time points (0, 24 and 72 hours) after the application of ^{15}N-labelled fertilizers. The experiment was planed, in a complete randomised design and four replicates. Two labelled N sources were used, $^{15}NH_4^+$ or $^{15}NO_3^-$. Accumulation of dry mass in shoots and roots, the amount of N originated from the fertilizer, as well as the maximal catalytic activities of nitrate reductase (NR) and glutamine synthetase (GS) were evaluated. N-NH_4^+ concentration in the soil decreased in a larger proportion than N-NO_3^- between T24 and T72. There were no differences in ^{15}N source abundance between NH4+ and NO_3^-, however, there was a gradual increase among time for leaves, stems and roots. The accumulation of N in the plants originated from the fertilizer NPFF in average for the four genotypes 72 hours after N application were 31 and 42% lower in NO_3^- for roots and shoots, respectively. This data confirm that sugarcane has a preference for ammonium uptake in comparison to nitrate in the first days after fertilization. At T72, about 11% of all N present in roots was shown to come from N applied as NH_4^+ source and 7.2% from NO_3^-. The correspondent values for the aerial part were lower, about 8% for NH_4^+ source and 5% for NO_3^-. The maximal activity of enzymes of primary N metabolism, NR and GS, were shown to be similar among the four genotypes: a linear increase in time for GS activity was found and for NR there was an increase from T0 to T24 followed by a decrease at T72. The four genotypes presented a preference for ammonium at T72, but without clear differences among genotypes pre-selected as efficient and not efficient.

Keywords: glutamine synthetase, nitrate reductase, nitrate, ^{15}N

3.1 Introdução

O Brasil é quarto maior consumidor mundial de fertilizantes NPK ficando atrás apenas de China, Índia e EUA com um montante utilizado em 2012 de 12,2 milhões de Mg, a agricultura brasileira consome cerca de 3,5 milhões de Mg de nitrogênio e a cana-de-açúcar, por sua vez, é a segunda cultura que mais consome esse fertilizante (22%), ficando atrás apenas do milho que demanda 25% (IFA, 2013). Do total de fertilizante nitrogenado utilizado na cana-de-açúcar em 2012, 700 mil toneladas (cerca de 66%) foram utilizados na forma de ureia, 18% na forma de nitrato de amônio e 16% na forma de sulfato de amônio (ANDA, 2013). Estimativas indicam que a área cultivada com a cana-de-açúcar vai aumentar rapidamente, podendo chegar a 14 milhões de hectares até 2020 (MATSUOKA et al., 2009). Juntamente com o aumento da área plantada, os volumes de N-fertilizante utilizados terão significativos incrementos uma vez que a cultura está expandindo para regiões de menor fertilidade o que demandaria aplicações de doses maiores desse nutriente (MARTINELLI; FILOSO, 2008). O Brasil é responsável por produzir cerca de 40% da cana-de-açúcar no mundo, e utiliza apenas 25% do N fertilizante utilizado nessa cultura (ROBINSON et al., 2011).

Não há dúvidas que o solo é o grande reservatório natural responsável por disponibilizar N às plantas, principalmente pelo processo de mineralização da matéria orgânica (EPSTEIN; BLOOM, 2004, CANTARELLA, 2007). Outras fontes também são consideradas importantes como a fixação biológica do N_2 atmosférico, a água de irrigação ou de chuva que contém quantidades variáveis de nitrogênio mineral (CANTARELLA, 2007), e até mesmo a amônia da atmosfera que pode ser absorvida pela folhagem (FARQUHAR et al.,1980; FENILLI et al., 2007). No entanto, é indiscutível a necessidade de suprimento de nutrientes via fertilizantes sintéticos.

Mesmo após 40 anos do descobrimento de bactérias diazotróficas vivendo na região da rizosfera da cana-de-açúcar (DÖBEREINER et al., 1972), e de uma série de trabalhos científicos realizados com fertilização nitrogenada e inoculação de bactérias diazotróficas nas mais diversas condições de solo, genótipos, clima e ciclos de cana-de-açúcar (URQUIAGA et al., 1992; SCHULTZ et al., 2012; SCHULTZ et al., 2014), a contribuição do N via fixação biológica realizado por bactérias é assunto ainda em aberto e pouco conclusivo. Em relação a adubação com nitrogênio em cana-de-açúcar, a literatura é bastante rica em trabalhos que avaliaram o efeito de doses, fontes e formas de aplicação de N na cultura, principalmente os seus efeitos na produtividade de colmos por área e nas características químicas e tecnológicas do caldo. Entretanto, as respostas são bem heterogêneas para cana planta (geralmente baixa

resposta a N) e relativamente homogêneas (alta resposta a N) para cana soca (CARNAÚBA, 1990). Aditivamente, por possuir extenso e bem distribuído sistema radicular (SMITH et al., 2005; OTTO et al., 2009), a cana-de-açúcar pode ser considerada uma cultura eficiente em aproveitar o N do solo. Nessa linha, estudos com fertilizantes marcados com ^{15}N demonstraram que a maior parte do N absorvido pela planta é proveniente do solo (CANTARELLA et al., 2007; FRANCO et al., 2008), sendo baixa a contribuição dos fertilizantes nitrogenados em relação ao N total absorvido pela cana-de-açúcar avaliado na colheita, variando de 5 a 16% (SAMPAIO et al., 1984; TRIVELIN et al., 1995; TRIVELIN et al., 1996; GAVA et al., 2001; TRIVELIN et al., 2002; TRIVELIN et al., 2002a; FRANCO et al., 2008, FRANCO et al., 2011).

Plantas terrestres absorvem predominantemente o nitrogênio inorgânico do solo, principalmente, nas formas de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) (WILLIAMS; MILLER, 2001), dois íons que quando absorvidos tem distintas consequências no metabolismo da planta (BRITTO; KRONZUCKER, 2002; 2005). Algumas espécies de plantas têm se mostrado capazes de produzir mais biomassa ou acumularem maiores quantidades de N quando crescem em presença de uma determinada fonte N em comparação com outra, ou seja, aparentemente há uma preferência de absorção por uma forma específica de N, em alguns casos designada pela letra grega β (BRITTO; KRONZUCKER, 2013). Não é recente o interesse em avaliar a preferência de absorção de fontes de N-fertilizante pelas plantas. Estudos realizados nas décadas de 80 e 90, com as culturas de trigo (CRAWFORD; CHALK, 1993), milho (MENGEL et al., 1983), diversas espécies nativas (FALKENGREN-GRERUP, 1995), tomate (EVANS et al., 1996), e até mesmo cana-de-açúcar (ARMAS et al., 1992), buscaram responder esse questionamento, no entanto esses autores não obtiveram evidências conclusivas que essas espécies demostravam a preferência de absorção do N-NH_4^+ ao invés de N-NO_3^- ou vice versa.

A fisiologia da preferência de absorção por amônio ou nitrato nas plantas está bem relatada na literatura (WILLIAMS; MILLER, 2001; MARSCHNER, 2008), assim como os processos que controlam a disponibilidade de NH_4^+ e NO_3^- em solos, juntamente com a interação com a rizosfera das plantas (FRANK; GROFFMAN, 2009). Em contraste, poucos estudos avaliaram as consequências da preferência das plantas por amônio ou nitrato no funcionamento dos ecossistemas, e a maioria dos estudos enfocam as consequências ecológicas de preferência das plantas para diferentes formas de N, não distinguindo explicitamente NH_4^+ ou NO_3^-, mas sim considerando "N inorgânico" versus "N orgânico" (HARRISON et al., 2007; KAHMEN et al., 2008).

De um ponto de vista energético, a absorção e assimilação NH_4^+ são menos onerosas do que a absorção e assimilação de NO_3^- (SALSAC et al., 1987). Assim, isso poderia constituir

uma vantagem para as plantas na absorção de NH_4^+. No entanto, alguns estudos mostraram que quando o NH_4^+ é a única fonte de N para as plantas, pode causar sintomas de toxicidade graves (DE GRAAF et al., 1998; BRITTO et al., 2001). Esta toxicidade de NH_4^+ poderia contrabalançar a vantagem energética em absorver mais NH_4^+ em vez de NO_3^-. Além disso, as plantas necessitam de grandes demandas de K^+, Ca^{2+}, e outros cátions, o que poderia causar um desiquilíbrio entre cátions e ânions nas células vegetais se apenas NH_4^+ fosse absorvido como fonte de N. Nesse caso, a absorção de NO_3^- proporciona um melhor equilíbrio de cargas para a célula das plantas (BOUDSOCQ et al., 2012). Outro fator importante está relacionado ao armazenamento, sendo muito mais fácil armazenar NO_3^- que NH_4^+ nos tecidos vegetais devido a consequências a nível celular da desregulação osmótica e da toxicidade de amônio às plantas, quando em altas concentrações.

Na absorção e assimilação de N, duas enzimas têm papel muito importante: a redutase do nitrato (RN), que é catalisadora da conversão do N inorgânico na forma de nitrato (NO_3^-) para a forma de nitrito (NO_2^-). O nitrito formado é exportado para o cloroplasto e, posteriormente, transformado em amônio (NH_4^+) pela ação da nitrito redutase (SANCHEZ; HELDT, 1990). O amônio produzido é então incorporado em ácidos orgânicos, dando origem aos aminoácidos, a partir de reações subsequentes catalisadas pelas enzimas glutamina sintetase (GS), enzima responsável pela conversão de glutamato (GLU) em glutamina (GLN), reação esta que utiliza um ATP e um cátion divalente como cofator, podendo ser Mg^{2+}, Mn^{2+} ou CO^{2+} (YANEVA et al., 2000).

No solo, os dois íons NH_4^+ e NO_3^- têm comportamentos distintos. Devido a carga positiva, o NH_4^+ pode ser adsorvido no complexo organo-mineral do solo (CTC). Por outro lado, a carga negativa do íon NO_3^- deixa essa forma de N muito mais móvel e, portanto, mais propensa as perdas por lixiviação (BRADY; WEIL, 2001; MARSCHNER, 2008). A mobilidade mais elevada do NO_3^- pode ajudar na difusão mais rápida pelas raízes e, consequentemente, para um acesso mais fácil para as plantas do NO_3^- que não é perdido. Estes custos fisiológicos e limitações físicas obrigam a planta ter estratégias em direções opostas e podem, assim, impor que as plantas se adaptem para absorver as duas formas N.

Com o exposto, o objetivo desse estudo foi verificar a preferência de absorção por amônio em relação ao nitrato em genótipos de cana-de-açúcar contrastantes em relação a eficiência de utilização de N (EUN), correlacionando com as atividades das enzimas do metabolismo primário do N.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Local, tratamentos e delineamento

Esta etapa foi realizada em câmara de crescimento (HGC 1514, Fitotron, Weiss Technik) no Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM) Campinas/SP (22º 48' 09" S, 47º 03' 11" O) no período de 11 de janeiro a 13 de Abril de 2015. O experimento teve uma duração total de 99 dias, sendo 30 dias de germinação dos mini toletes e os outros 69 dias para o crescimento das plantas.

Os tratamentos foram compostos de quatro genótipos previamente selecionados quanto a eficiência e a resposta a adubação nitrogenada com base no experimento de EUN por genótipos Ridesa, apresentado no capítulo 2 desse trabalho (*Figura 2.3)*, sendo: eficiente e responsivo o RB975375, eficiente e não responsivo o RB937570, não eficiente e responsivo o RB867515 e não eficiente e não responsivo o RB92579. Esses genótipos foram avaliados em três períodos 0, 24 e 72 horas (*T0*, *T24* e *T72*) após a aplicação do fertilizante nitrogenado. O delineamento inteiramente casualizado com 4 repetições foi adotado para este trabalho, sendo os tratamentos principais os genótipos e os tratamentos secundários os tempos de avaliação.

3.2.2 Condições de crescimento

As mudas dos quatro genótipos (mini toletes de 1 gema com 25 mm de comprimento) foram obtidas do terço médio de colmos maduros de plantas cultivadas em condições de campo controlado (viveiro) de excelente sanidade. Após a coleta dos colmos sementes, os mesmos foram germinados e cultivados por 4 semanas em bandejas de crescimento, na presença de vermiculita inerte sem nutrientes. Ao término deste período, uma plântula foi transferida definitivamente para um pote plástico com fundo fechado e capacidade de 4 L.

O solo foi retirado da camada superficial (0 - 20 cm), de uma área cultivada com cana-de-açúcar por mais de 30 anos em sistema não mecanizado com queima prévia do canavial, tendo sido nos últimos oito anos colhida mecanicamente com preservação de resíduos sobre o solo. A caracterização químico-física do solo é apresentada na Tabela 3.1.

A correção da acidez do solo e elevação dos teores de cálcio e magnésio foi realizada por meio da aplicação de calcário dolomítico (PRNT 90%) para atingir o índice de saturação por bases de 70% da CTC de acordo com o descrito em Raij et al. (2001). Foram aplicados 2 gramas de calcário em cada vaso. Após a calagem, o solo foi incubado por 30 dias com a umidade ajustada para 65% da capacidade máxima de retenção de água.

Tabela 3.1. Características químicas e físicas do solo utilizado para a realização do experimento.

Prof	C.O.T.	pH	P	Ca	Mg	K	CTC	Argila	silte	areia
m	g dm^{-3}	$CaCl_2$	mg dm^{-3}	----mmolc dm^{-3} -----				--------- g dm^{-3}--------		
0-0,20	9,5	4,7	2	13	3	0,5	43	163**	24	813

*Análise realizada segundo metodologia de Raij et al. (2001). **Análise realizada segundo metodologia da Embrapa, (1997). C.O.T: Carbono orgânico total;

Sete dias após o transplantio das mudas para os vasos (uma única planta), todas as plantas receberam 120 e 150 mg kg^{-1} de fosforo e potássio, respectivamente, na forma de KH_2PO_4 e uma solução de micronutrientes contendo 3 mg kg^{-1} de Zn (sulfato de zinco), 1 mg kg^{-1} de B (ácido bórico), 0,5 mg kg^{-1} de Cu (sulfato de cobre), 5 mg kg^{-1} de Fe (EDTA férrico), 4 mg kg^{-1} de Mn (sulfato de manganês) e 0,3 mg kg^{-1} de Mo (molibidato de sódio). Após um mês de crescimento, as plantas foram supridas com N (100 mg kg^{-1} na forma de NO_3NH_4).

Os parâmetros de temperatura e umidade estabelecidos para o crescimento das plantas foram: para o período diurno (das 7:00 as 19:00h) adotou-se 30 ºC de temperatura e 70% de umidade relativa (UR); para o período noturno (das 19:01 as 6:59h) 24º C e 80% de UR. O fotoperíodo escolhido foi de 12 horas luz sendo que quando as plantas estavam jovens a irradiância (fluxo de fótons) medida sob o dossel foi de 1200 µmol m^{-2} s^{-1}. No segundo período, quando as plantas estavam mais desenvolvidas, depois de 30 dias de crescimento a irradiância foi aumentada para 1400 µmol m^{-2} s^{-1}. A umidade dos vasos foi mantida em 65% da capacidade máxima de retenção, sendo controlada diariamente por meio da pesagem de 20% dos vasos para o cálculo da massa de água perdida.

Após 60 dias de crescimento das plantas foi aplicado uma solução de nitrogênio marcado. Com exceção dos 16 vasos do tempo 0, metade dos vasos recebeu 10 mMol de N na forma $K^{15}NO_3$ (4,02 % de átomos ^{15}N) + 10 mMol de N na forma de $(NH_4)_2SO_4$ e a outra metade dos vasos recebeu 10 mMol de N na forma $(^{15}NH4)_2SO_4$ (4,18 % de átomos ^{15}N), + 10 mMol de N na forma KNO_3. Para evitar possível nitrificação do N-NH_4, em todos os vasos aplicou-se dicianodiamida (reconhecido inibidor da nitrificação) na dose de 10% da dose de N aplicado.

3.2.3 Avaliações

Antes da aplicação dos tratamentos avaliou-se as plantas coletadas no tempo 0 (*T0*), sendo 4 repetições por genótipo. Em seguida, decorridas 24 horas da aplicação das fontes marcadas, foram colhidas as plantas do *T24*, sendo 8 vasos por genótipo: 4 com aplicação do $^{15}NH_4$ e 4 com $^{15}NO_3$. Esse mesmo procedimento foi repetido após 72 horas (*T72*). Em cada

avaliação (*T0, T24* e *T72*) retirou-se uma porção, sem a nervura, da folha+1 para realização da análise da atividade enzimática da glutamina sintetase (GS) e redutase do nitrato (RN). Para isso, esse material foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 ºC. Com o mesmo objetivo, amostras de raízes vivas (porção de aproximadamente 1 g de material fresco) foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Em seguida, as plantas foram separadas em folhas, caules e raízes, sendo colocadas para secagem em estufas de circulação forçada de ar a 65 ºC. Posteriormente, realizou-se a moagem das amostras em moinho de facas tipo Willey para futura determinação da abundância isotópica e de porcentagem de N (%) em espectrômetro de massas (modelo ANCA-GSL Hydra 20-20 SERCON Co., Crewe, GBR) acoplado a um analisador automático de N (BARRIE; PROSSER, 1996).

Em cada tempo de avaliação, em todas as repetições, uma sub-amostra de solo foi retirada para a determinação do N - inorgânico no solo ($N\text{-}NH_4^+$ e $N\text{-}NO_3^-$). As amostras foram armazenadas imediatamente em freezer em temperatura de -5 ºC, para diminuir a atividade microbiológica, para que não se alterasse os teores de $N\text{-}NH_4^+$ e $N\text{-}NO_3^-$ no solo.

Para a extração das formas inorgânicas de N no solo, duas amostras (duplicata) de 5 gramas de solo (base úmida com 25 mL de solução de KCl 2 M) foram agitadas em mesa agitadora orbital por 1 hora, e filtradas em papel filtro analítico faixa azul. Posteriormente, nos extratos foi determinado o N inorgânico por meio de sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA). O $N\text{-}NH_4^+$ foi analisado em meio alcalino, passando por membrana hidrofóbica (PTFE), sendo o fluxo direcionado para uma cela de condutividade (REIS et al., 1997). As formas de N nítrico ($N\text{-}NO_3^-$ + $N\text{-}NO_2^-$) foram determinadas simultaneamente por método espectrofotométrico, mediante a redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio coperizado, seguida da reação do nitrito com sulfanilamida em meio ácido, formando um azo composto (GINÉ et al., 1980). Os resultados de N mineral foram corrigidos pela umidade do solo e expressos em massa de terra seca em estufa (TSE), após a secagem de subamostras de solo em estufa a 105 ºC.

3.2.4 Atividade de enzimas do metabolismo de nitrogênio

A fim de identificar possíveis variações nas enzimas de assimilação primárias de N na planta quantificou-se, na folha e nas raízes, a atividade catalítica máxima das enzimas redutase do nitrato (RN) e glutamina sintetase (GS), nos tempos de 0, 24 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos, em apenas uma das fontes aplicadas, uma vez que, as proporções de NH_4^+ e NO_3^- foram as mesmas alterando apenas a marcação na fonte. No momento da avaliação, porções do

terço médio da folha +1 foram retiradas e colocadas em nitrogênio líquido, assim como uma pequena porção das raízes (aproximadamente 1 g massa fresca), tendo o cuidado de retirar apenas raízes vivas. Depois da coleta, as amostras foram transferidas para um Freezer -80ºC até o momento da maceração (realizada na presença de nitrogênio líquido em moinho de bolas).

Para acessar a atividade da glutamina sintetase (GS), foi utilizada uma adaptação do protocolo de O'Neal & Joy (1973) para microplacas. Assim, alíquotas de 200 mg de material vegetal maceradas em nitrogênio líquido foram extraídas com 600 µL (folhas) ou 400 µL (raízes) de tampão Tris 100 mM (pH 7.6) contendo $MgCl_2$1 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM e leupeptina 4 µM. Devido à dificuldade de se obter uma rápida separação entre a glutamina produzida na reação e o substrato glutamato, hidroxilamina (NH_2OH) tem sido bastante utilizada como um substrato alternativo para amônia (reação 1) (LEA et al., 1990). Após centrifugação (14000 rpm, 10 min, 4 ºC), o extrato (50 µL) foi incubado com mix de reação [tampão Tris 100 mM (pH 7.6) contendo $MgSO_4.7H_2O$ 20 mM, glutamato 80 mM, NH_2OH 6 mM e EDTA 4 mM] na ausência (branco) ou presença de ATP 8 mM, num volume final de 150 µL. A reação prosseguiu por 30 min a 30 ºC e foi cessada com adição de 150 µL de solução contendo $FeCl_3$ 0.37 M, ácido tricloroacético 0.2 M e HCl 0.67 M. Após centrifugação (4000 rpm, 2 min), 200 µL de cada amostra foram transferidos para uma nova microplaca e a leitura de absorbância realizada a 540 nm. A quantificação da atividade da enzima foi possível por meio do uso de uma curva padrão contendo diferentes concentrações de γ glutamilmonohidroxamato.

Reação 1. Glutamate + NH_2OH $\xrightarrow{GS}$ + ATP γ-Glutamylhydroxamate + ADP + Pi + H_2O

Para determinar a atividade da redutase do nitrato (NR) (reação 2), alíquotas de 200 mg de material vegetal maceradas em nitrogênio líquido foram extraídas com 600 µL de tampão fosfato 100 mM (pH 7.5) contendo EDTA 1 mM, DTT 5 mM, leupeptina 4 µM e PVP 2% (m/v). Após centrifugação (14000 rpm, 10 min, 4 ºC), o extrato (40 µL) foi incubado com mix de reação [tampão fosfato 100 mM (pH 7.5) contendo KNO_3 10 mM, EDTA 2mM, DTT 5 mM e NADH 0.2mM] num volume total de 160 µL. A reação prosseguiu por 15 min a 30 ºC e foi cessada com adição de 40 µL de acetato de zinco 0.5 M, para retirar o NADH residual. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (4000 rpm, 2 min), 100 µL transferidos para uma nova microplaca e adicionados 50 µL de sulfanilamida 1% em HCl 3M

e 50 µL de dicloridrato de n-(1-naftil)-etilenodiamina 0.1%. Após 20 min, a leitura de absorbância foi realizada a 540 nm. A quantificação da atividade da enzima foi possível devido ao uso de uma curva padrão contendo diferentes concentrações de nitrito de sódio (WRAY & FIDO, 1990).

Reação 2. $NO_3 + NADH + H^+ \overset{NR}{\rightleftharpoons} NO_2 + NAD^+ + H_2O$

3.2.5. Analises estatísticas

Todas as análises estatísticas dessa etapa foram realizadas com o programa Sisvar versão 5.6 (UFLA, Lavras, MG). Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) por meio do teste F, quando significativo $p \leq 0,05$, utilizou-se o teste t para comparação de médias, com 5% de probabilidade. Para os teores de N no solo utilizou-se a comparação entre os tempos de avaliação dentro de cada fonte. Para as variáveis, acúmulo de massa seca e de N nas diferentes partes da planta, teor de N e abundância de ^{15}N, a análise foi realizada em esquema fatorial com três fatores 4x3x2 sendo quatro genótipos, três tempos de avaliação e duas fontes de N marcado. Nessas variáveis o tempo zero (*T0)* foi considerado para as ambas as fontes. Para os acúmulos de N na planta e na raiz proveniente do fertilizante, utilizou-se fatorial 4x2x2 tendo apenas os tempos *T24* e *T72*, e para as análises das atividades enzimáticas considerou-se um fatorial simples sendo 4x3 quatro genótipos nos três tempos de avaliação.

3.3. Resultados

3.3.1 N inorgânico no solo, acúmulo de massa seca e N na planta

No momento da instalação do experimento em fevereiro/2015 o solo utilizado tinha cerca de 20 mg kg^{-1} de N-NH_4^+ e 35 mg kg^{-1} de N-NO_3^-. Com o desenvolvimento das plantas e consequente absorção antes da aplicação dos tratamentos no tempo zero (*T0)*, não havia amônio no solo, e os teores de nitrato eram de cerca de 25 mg kg^{-1} de solo com $n = 8$. Houve diferença nos teores de N-NH_4^+ entre os tempos *T24* e *T72* em ambas as fontes aplicadas, com exceção do genótipo RB92579 ($p<0,05$). Em média, 24 horas após a aplicação dos tratamentos, os teores de amônio foram de 33,6 e 34,3 mg kg^{-1}, decrescendo após 72 horas para 20,1 e 19,8 mg kg^{-1} para as fontes $^{15}NH_4^+$ e $^{15}NO_3^-$, respectivamente (Tabela 3.1). Nos teores de N-NO_3^-, apenas os genótipos RB867515 e RB937570 apresentaram resultados distintos entre os tempos de

avaliação (24 e 72 horas). Os valores médios de N-NO_3^- no solo 24 horas após a aplicação dos tratamentos foram de 63,9 e 60,9 mg kg^{-1} decaindo para 43,0 e 49,6 mg kg^{-1} para as fontes $^{15}NH_4^+$ e $^{15}NO_3^-$, respectivamente (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Disponibilidade de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo (mg kg^{-1}) em função da aplicação de nitrogênio marcado em quatro genótipos contrastantes na EUN.

Fonte utilizada	Tempo de avaliação	Genótipos			
		RB867515	RB975375	RB92579	RB937570
	horas	---------- NH_4^+ mg kg^{-1} ----------			
	0	0,0	0,0	0,0	0,0
$^{15}NH_4^+$	24	35,4 a	34,4 a	35,2 a	29,5 a
	72	20,9 b	17,4 b	28,1 a	14,0 b
$^{15}NO_3^-$	24	38,1 a	33,2 a	35,2 a	30,6 a
	72	21,5 b	12,4 b	22,0 a	23,1 b
		---------- NO_3^- mg kg^{-1} ----------			
	0	21,8	31,9	28,4	20,0
$^{15}NH_4^+$	24	56,9 a	56,3 a	74,2 a	68,2 a
	72	35,7 b	42,5 a	44,5 b	49,4 a
$^{15}NO_3^-$	24	65,3 a	57,0 a	60,4 a	60,7 a
	72	40,9 b	56,9 a	47,6 b	53,2 a

Letras minúsculas comparam os teores de N dentro de uma mesma fonte entre os tempos de avaliação 24 e 72 horas;

Não houve diferença para o acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR) entre os tempos de coleta e entre as fontes aplicadas. Entretanto, os genótipos diferiram entre si no tempo *T24* para ambas as fontes para MSPA, e em todos os tempos e fontes para MSR. O genótipo com melhor desempenho para acúmulo de MSPA foi o RB937570 (Figura 3.1A), por outro lado esse mesmo genótipo apresentou os menores acúmulos de MSR juntamente com o genótipo RB92579 (Figura 3.1B).

Os teores de N na raiz diferiram entre os genótipos no tempo *T0* e na fonte NO_3^- após 72 horas. Nesses dois tempos, o genótipo com os maiores acúmulos de N foi o RB92579, que diferiu dos genótipos RB867515 e RB975375 no tempo *T0* e foi superior ao RB867515 e RB937570 no tempo *T72*. O acúmulo de N nas raízes também apresentou diferenças na avaliação *T24* para a fonte NO_3^- e no tempo *T72* para ambas as fontes. Mesmo tendo os maiores teores, o genótipo RB92579 acumulou menos N nas raízes em relação ao RB867515 nas avaliações *T24* e *T72* (Tabela 3.3).

Quanto aos teores de N na parte aérea (PA), em todos os tempos de coleta houve diferenças entre os genótipos. Nesse parâmetro o genótipo RB867515 foi superior em relação ao RB937570 em todos os tempos avaliados. Não houve diferenças entre os acúmulos de N na PA e entre os genótipos dentro de cada tempo de coleta, apenas entre os tempos de avaliação, em que os maiores acúmulos foram observados para *T72*, sendo superior ao *T0* porém igual ao *T24* (Tabela 3.3). Uma exceção foi o genótipo RB867515, que não apresentou diferenças entre os tempos de coleta no acúmulo de N pela PA.

A abundância isotópica na PA (átomos % de ^{15}N) foi maior no *T72* em relação ao *T24* e *T0* (Tabela 3.3). Os valores de abundância em *T0* foram próximas ao natural 0,3667 átomos %, em *T24* a média dos 4 genótipos foi de 0,519 e 0,498 átomos % nas raízes e 0,454 e 0,433 átomos % na PA para NH_4^+ e NO_3^-, respectivamente. Em *T72* foram de 0,764 e 0,629 átomos % para raízes e 0,677 e 0,558 átomos % na PA para $^{15}NH_4^+$ e $^{15}NO_3^-$ respectivamente.

Em relação ao teor de N, acúmulo de massa seca e de N nas folhas verificaram-se diferenças entre os genótipos ($p<0,05$). O RB867515 e o RB937570 apresentaram os maiores acúmulos de massa seca nas folhas em todos os tempos de avaliação e de acúmulo de N nas folhas no tempo 0 *(T0)*. Os valores de massa seca nas folhas variaram de 6,9 a 10 g por vaso, enquanto os acúmulos de N tiveram uma maior variação, de 118 a 162 mg de N por vaso.

As variáveis teor de N, acúmulo de massa seca e de N nas folhas e caules, assim como abundância de ^{15}N, não foram influenciadas pela fonte de N aplicada. No entanto, o teor de N na folha, acúmulo e abundância de ^{15}N na folha e no caule diferiram entre os tempos de avaliação. As abundâncias de ^{15}N obtidas nas folhas e nos caules no tempo *T0*, foram muito próximas ao natural de 0,3667 átomos de ^{15}N, mas no *T24* houve um incremento, sendo em média de 0,429 átomos % e 0,413 átomos % na folha; 0,479 átomos % e 0,453 átomos % no caule para $^{15}NH_4^+$ e $^{15}NO_3^-$, respectivamente. Em *T72* as abundâncias médias foram de 0,558 átomos % e 0,505 átomos % na folha; 0,796 átomos % e 0,612 átomos % no caule para NH_4^+ e NO_3^-, respectivamente (Tabela 3.4).

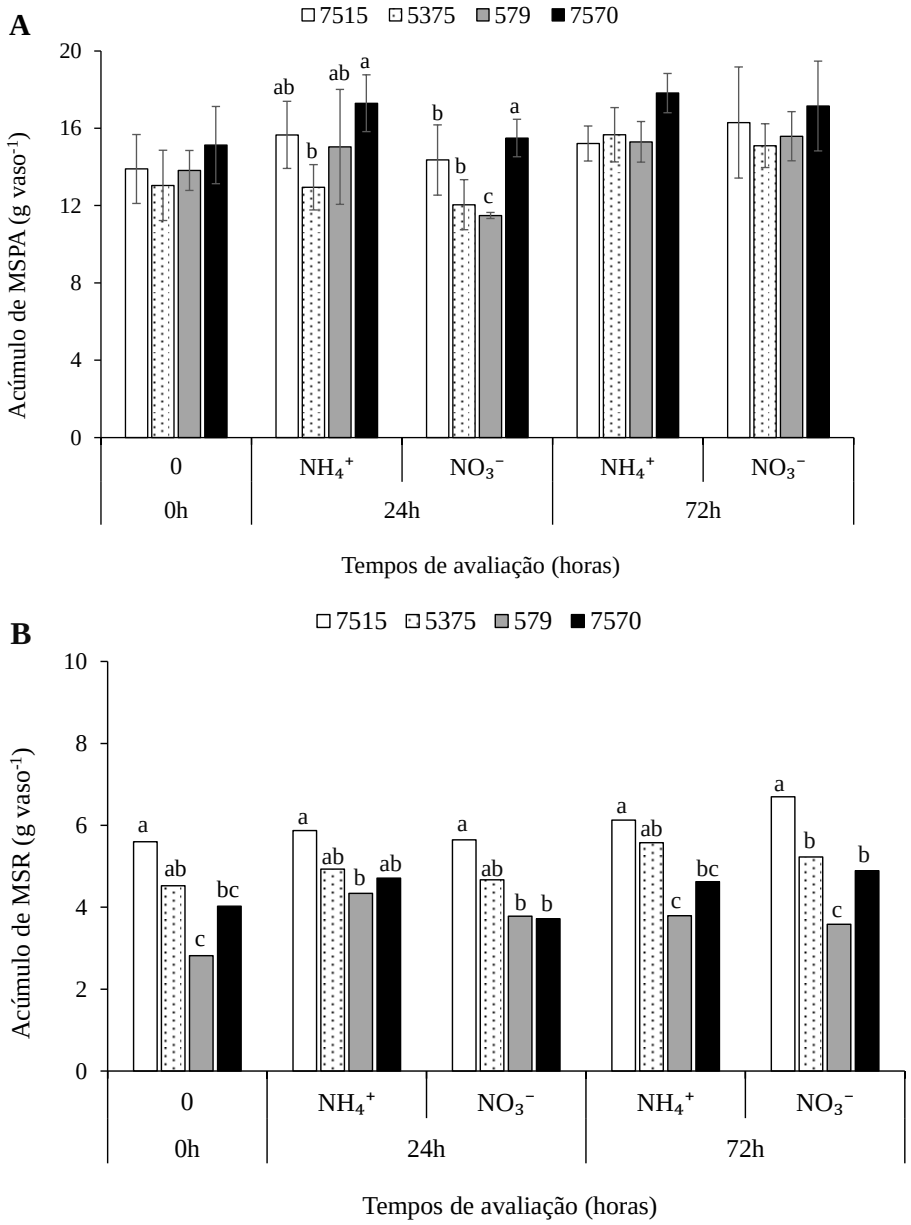


Figura 3.1. Acúmulo de massa seca da parte aérea (MSPA) (A), e nas raízes (MSR) (B) em função da aplicação do N marcado em genótipos contrastantes em EUN. Letras minúsculas comparam os genótipos num mesmo tempo e fonte.

Tabela 3.3. Teor, abundância de ^{15}N e acúmulo de N nas raízes e parte aérea (PA) em genótipos contrastantes em EUN em função da aplicação de fontes de N marcado.

Tempo	Fonte	Genótipo	Raiz			PA		
			N	**^{15}N**	**N-Acum.**	**N**	**^{15}N Raiz**	**N-Acum.**
			%	átomos %	mg vaso^{-1}	%	átomos %	mg vaso^{-1}
0		7515	0,91 **c**	0,365 **B**	51,0 **B**	1,62 **a**	0,367 **B**	224,4
		5375	0,97 **bc**	0,366 **B**	42,6 **B**	1,52 **abB**	0,367 **B**	197,6 **B**
		579	1,23 **a**	0,367 **B**	35,3 **B**	1,42 **abB**	0,367 **B**	195,5 **B**
		7570	1,15 **ab**	0,367 **B**	45,9	1,40 **b**	0,369 **B**	210,5 **B**
24	NH_4^+	7515	1,15	0,533 **AB**	67,2 **AB**	1,63 **ab**	0,448 **B**	254,2
		5375	1,18	0,530 **B**	57,6 **AB**	1,74 **a**	0,465 **B**	225,0 **AB**
		579	1,28	0,491 **B**	54,7 **A**	1,72 **aA**	0,446 **B**	256,5 **A**
		7570	1,21	0,523 **B**	57,1	1,46 **b**	0,458 **B**	252,1 **AB**
	NO_3^-	7515	1,15	0,503 **AB**	65,2 **aAB**	1,71 **bc**	0,431 **AB**	244,1
		5375	1,14	0,498 **AB**	53,6 **abAB**	1,79 **abA**	0,435 **AB**	215,0 **AB**
		579	1,23	0,484	45,5 **b**	1,96 **aA**	0,440 **AB**	240,0 **AB**
		7570	1,17	0,508 **AB**	43,6 **b**	1,56 **c**	0,427	241,9 **AB**
72	NH_4^+	7515	1,30	0,745 **A**	79,7 **aAB**	1,75 **a**	0,689 **A**	265,9
		5375	1,18	0,751 **A**	65,7 **abAB**	1,72 **a**	0,690 **A**	270,0 **A**
		579	1,30	0,772 **A**	49,4 **b**	1,73 **aA**	0,661 **A**	264,6 **A**
		7570	1,30	0,790 **A**	60,0 **bA**	1,50 **b**	0,669 **A**	267,8 **A**
	NO_3^-	7515	1,15 **b**	0,643 **A**	77,4 **aA**	1,60 **a**	0,584 **A**	258,9
		5375	1,31 **ab**	0,687 **A**	68,2 **ab**	1,69 **aA**	0,563 **A**	254,2 **A**
		579	1,42 **a**	0,597	50,2 **b**	1,64 **aA**	0,559 **A**	255,7 **A**
		7570	1,23 **b**	0,590 **A**	59,9 **ab**	1,51 **a**	0,527	258,9 **A**
p<0,05 Tempo			ns	*	*	*	*	*
p<0,05 Fonte			ns	ns	ns	ns	ns	ns
p<0,05 Genótipos			*	ns	*	*	ns	ns
CV			13,9	29	24	9,6	25	14,4
DMS			0,23	0,22	19	0,22	0,17	48

CV: coeficiente de variação (%); DMS: diferença mínima significativa; p<0,05: significativo a 5% de probabilidade teste T; N-Acum.: Acúmulo de N; Letras minúsculas comparam genótipos no mesmo tempo dentro de cada fonte marcada; Letras maiúsculas comparam cada genótipo entre os tempos. Nesse caso a letra maiúscula em T0 equivale para ambas as fontes, concidentemente foi a mesma caso não fosse seria destacada permitindo a distinção.

Tabela 3.4. Acúmulo de massa seca (MS), teor de N, abundância isotópica (^{15}N) e acúmulo de N nas folhas e caules em função da aplicação de diferentes fontes de N marcado aplicadas em genótipos contrastantes em EUN.

Tempo	Fonte	Genótipo	Folha				Caule			
			MS	**Teor**	**^{15}N**	**N-Acum.**	**MS**	**Teor**	**^{15}N**	**N-Acum.**
			g	%	átomos %	mg vaso^{-1}	g	%	átomos %	mg vaso^{-1}
0		7515	9,1 **ab**	1,60	0,367 **B**	144,9 **a**	4,8	1,69	0,367 **B**	79,4
		5375	8,5 **b**	1,52 **B**	0,367 **B**	127,4 **ab C**	4,6	1,54	0,367 **B**	70,2 **B**
		579	8,3 **b**	1,42 **B**	0,367 **B**	118,0 **b** C	5,5	1,45	0,367 **B**	77,5 **B**
		7570	10,0 **a**	1,38	0,371 **B**	137,9 **ab**	5,1	1,46	0,367 **B**	72,7 **B**
24	NH_4^+	7515	9,0 **a**	1,71 **ab**	0,422 **B**	153,5	6,6	1,51	0,474 **B**	100,7
		5375	7,5 **b**	1,84 **aA**	0,429 **B**	137,7 **AB**	5,5	1,61	0,500 **B**	87,3 **AB**
		579	7,5 **b**	1,83 **aA**	0,426 **B**	135,8 **AB**	7,6	1,63	0,466 **B**	120,6 **A**
		7570	9,4 **a**	1,54 **b**	0,439 **B**	145,3	7,8	1,37	0,477 **B**	106,8 **A**
	NO_3^-	7515	8,0 **ab**	1,78 **ab**	0,413 **AB**	141,8	6,4	1,63	0,448 **AB**	102,3
		5375	7,0 **b**	1,85 **aA**	0,417 **AB**	128,9	5,1	1,72	0,454	86,1 **AB**
		579	6,9 **b**	1,92 **aA**	0,414 **AB**	132,0 **AB**	6,8	1,74	0,467 **AB**	107,9 **AB**
		7570	8,7 **a**	1,59 **b**	0,408	138,7	6,8	1,53	0,445	103,2 **AB**
72	NH_4^+	7515	9,0 **ab**	1,80 **ab**	0,544 **A**	162,0	6,2	1,67	0,835 **A**	103,9
		5375	8,9 **ab**	1,76 **abA**	0,581 **A**	156,6 **A**	6,8	1,67	0,798 **A**	113,4 **A**
		579	8,0 **b**	1,94 **aA**	0,558 **A**	154,4 **A**	7,3	1,50	0,763 **A**	110,2 **A**
		7570	10,0 **a**	1,58 **b**	0,551 **A**	159,0	7,8	1,40	0,788 **A**	108,8 **A**
	NO_3^-	7515	9,45 **ab**	1,62 **ab**	0,502 **A**	151,7	6,8	1,56	0,665 **A**	107,3
		5375	8,44 **bc**	1,70 **abA**	0,527 **A**	143,7	6,7	1,66	0,599	110,5 **A**
		579	7,89 **c**	1,82 **aA**	0,510 **A**	143,4 **A**	7,7	1,45	0,608 **A**	112,3 **A**
		7570	9,90 **a**	1,52 **b**	0,480	149,5	7,2	1,51	0,575	109,4 **A**
p<0,05 Tempo			ns	*	*	*	ns	ns	*	*
p<0,05 Fonte			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
p<0,05 Genótipos			*	*	ns	*	ns	ns	ns	ns
CV			11,3	11,2	18	11	26	14,3	32	25
DMS			1,4	0,27	0,11	21,8	2,3	0,31	0,5	33,8

CV: coeficiente de variação (%); DMS: diferença mínima significativa; p<0,05: significativo a 5% teste T; MS: massa seca; N-Acum.: Acúmulo de N; Letras minúsculas comparam genótipos num mesmo tempo e fonte; Letras maiúsculas comparam cada genótipo entre os tempos na mesma fonte em relação ao T0. Nesse caso a letra maiúscula em T0 equivale para ambas as fontes, concidentemente foi a mesma caso não fosse seria destacada permitindo a distinção.

3.3.2 Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante e atividade das enzimas do metabolismo de N

Depois de 24 horas após a aplicação dos tratamentos, a quantidade de nitrogênio nas raízes da planta proveniente do fertilizante (NPPF) foram baixas, em média de 2,5 mg nas plantas tratadas com $^{15}NH_4^+$ e 1,8 mg naquelas nutridas com $^{15}NO_3^-$ e de 5,6 e 4,0 mg de NPPF na PA nos tratamentos $^{15}NH_4^+$ e $^{15}NO_3^-$, respectivamente. Nesse tempo de avaliação não se observou diferenças entre os genótipos e nem entre fontes de N (Figura 3.2 A e B). Por outro lado, em *T72* verificou-se um NPPF pelo menos 3 vezes maior que em *T24*, sendo estatisticamente superior para a fonte $^{15}NH_4^+$ em relação a fonte $^{15}NO_3^-$ nas raízes e na PA, com exceção do genótipo RB975375, em que não houve diferença entre as fontes nas raízes. Em relação ao acúmulo de NPPF derivado do $^{15}NO_3^-$, ocorreu diferença entre os genótipos nas raízes, sendo o RB867515 e o RB975375 superiores ao RB92579 e RB937570 (Figura 3.2A). O NPPF médio dos genótipos em *T72* foi de 6,8 mg para plantas tratadas com $^{15}NH_4^+$ e 4,7 mg para aquelas fertilizadas com $^{15}NO_3^-$ nas raízes e de 22,2 e 12,7 mg na PA nas fontes $^{15}NH_4^+$ e $^{15}NO_3^-$ respectivamente.

Quando somados o NPPF da raiz e PA, as diferenças entre as fontes aumentaram, no entanto, não se verificou diferença estatística em *T24* (Figura 3.3A). Em *T24* obteve-se um NPPF médio de 8 e 6 mg por planta, representando 2,6 e 2,0% do total de N acumulado na planta para as fontes NH_4^+ e NO_3^- respectivamente. Em *T72* o NPPF da planta foi pelo menos 3 vezes superior, sendo de 29 mg derivado do NH_4^+ e 17 mg proveniente do NO_3^-, representando 8,9 e 5,4 % do N total da planta para as fontes tratadas com $^{15}NH_4^+$ e $^{15}NO_3^-$, respectivamente (Figura 3.3 A e B).

Compartimentalizando o NPPF, verificou-se que em média 30% do N total absorvido da fonte marcada foi recuperado nas folhas, 41% nos caules e 29% nas raízes. Nas raízes o NPPF (%) relativo de todo NPPF da planta foi em média de 32% em *T24* decrescendo para 26% em *T72*, por outro lado, no caule passou de 39% para 44% entre os tempos *T24* e *T72*. Nas folhas o NPPF (%) relativo manteve-se mais estável entre os tempo de avaliação oscilando entre 30 e 31% (Figura 3.4).

De modo geral a atividade máxima da enzima GS aumentou linearmente ao longo do tempo de avaliação nas folhas. Nas raízes em *T0* e *T24* foram iguais, sendo inferiores a *T72*. Verificou-se diferenças genotípicas apenas em *T24* nas folhas, em que o genótipo RB937570 se destacou, apresentando maior atividade que os demais. As atividades médias da

enzima GS nas folhas foram duas vezes maiores em *T72* em relação ao *T0*, passando de 2,65 para 5,93 (µmol GHA^{-1} h^{-1} g^{-1} massa fresca) (Figura 3.5A). Nas raízes as atividades da GS foram menores, de 1,67 (*T0*), 1,90 (*T24*) e 3,04 (*T72*) µmol GHA^{-1} h^{-1} g^{-1} massa fresca, menos da metade dos valores obtidos na folha (Figura 3.5B).

As atividades da enzima RN foram menores que 1,0 nas folhas e menores que 0,5 nas raízes (µmol NO_2 h^{-1} g^{-1} massa fresca). Diferença genotípica nas folhas foi observada em *T24*, em que o genótipo RB975375 diferenciou-se do genótipo RB92579 (Figura 3.5C). Os valores de atividade da RN nas folhas em *T24* foram superiores a *T72* para o genótipo RB975375. Para o genótipo RB92579, as atividades da RN em *T24* foram maiores que em *T0*, porém iguais aquelas obtidas em *T72*. Para os genótipos RB867515 e RB937570 não houve diferenças entre os tempos de avaliações (Figura 3.5C). Em conjunto, os resultados de atividade enzimática mostraram que nas condições experimentais utilizadas as enzimas que metabolizam N têm maior atividade nas folhas em relação às raízes, sendo que a atividade da GS foi superior à atividade da NR.

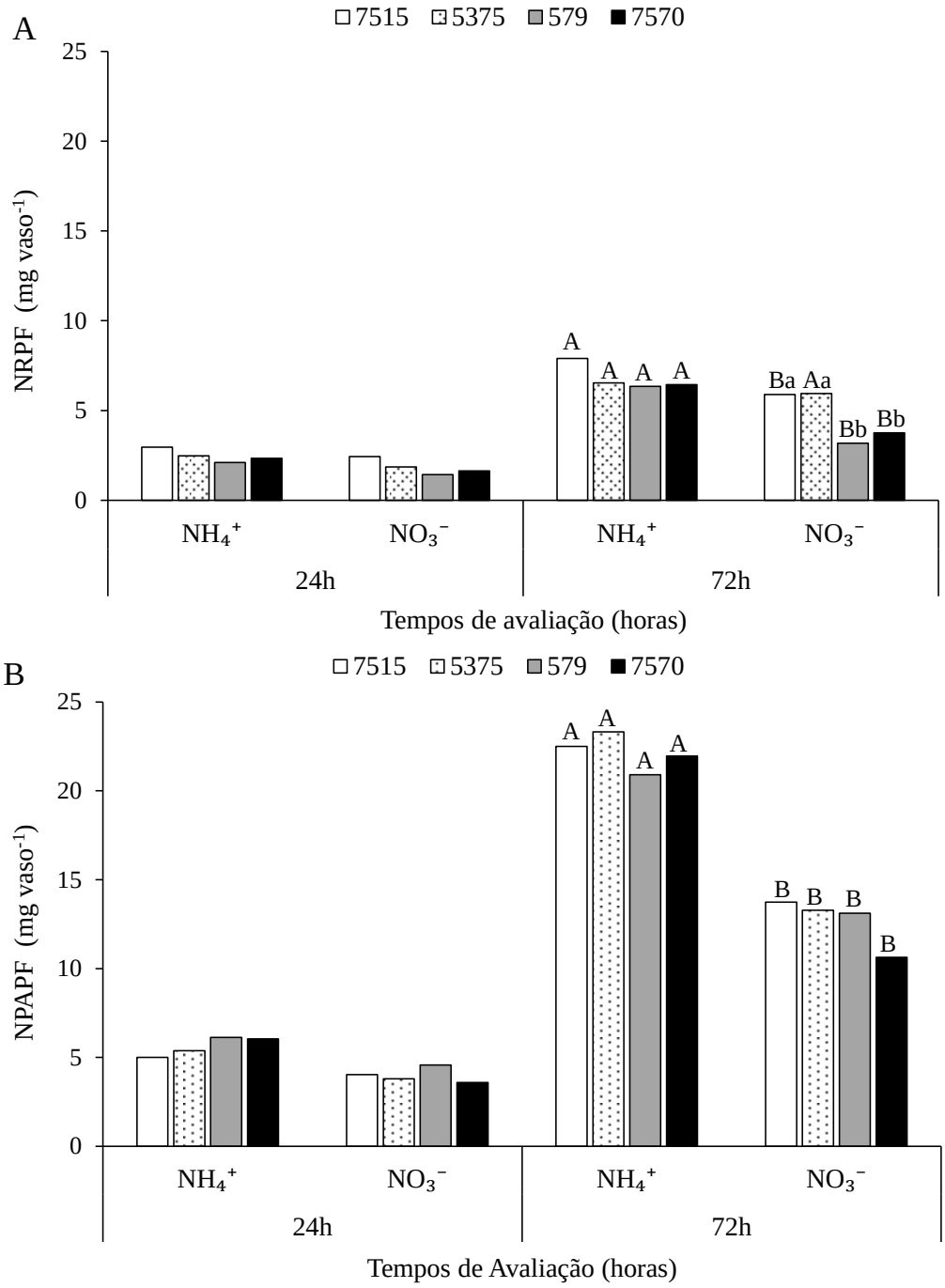


Figura 3.2. Nitrogênio na raiz proveniente do fertilizante (NRPF) em mg vaso^{-1} (A) e nitrogênio na parte aérea proveniente do fertilizante (NPAPF) mg vaso^{-1} (B) em função da aplicação de nitrogênio marcado em dois tempos de avaliação em genótipos contrastantes em EUN.

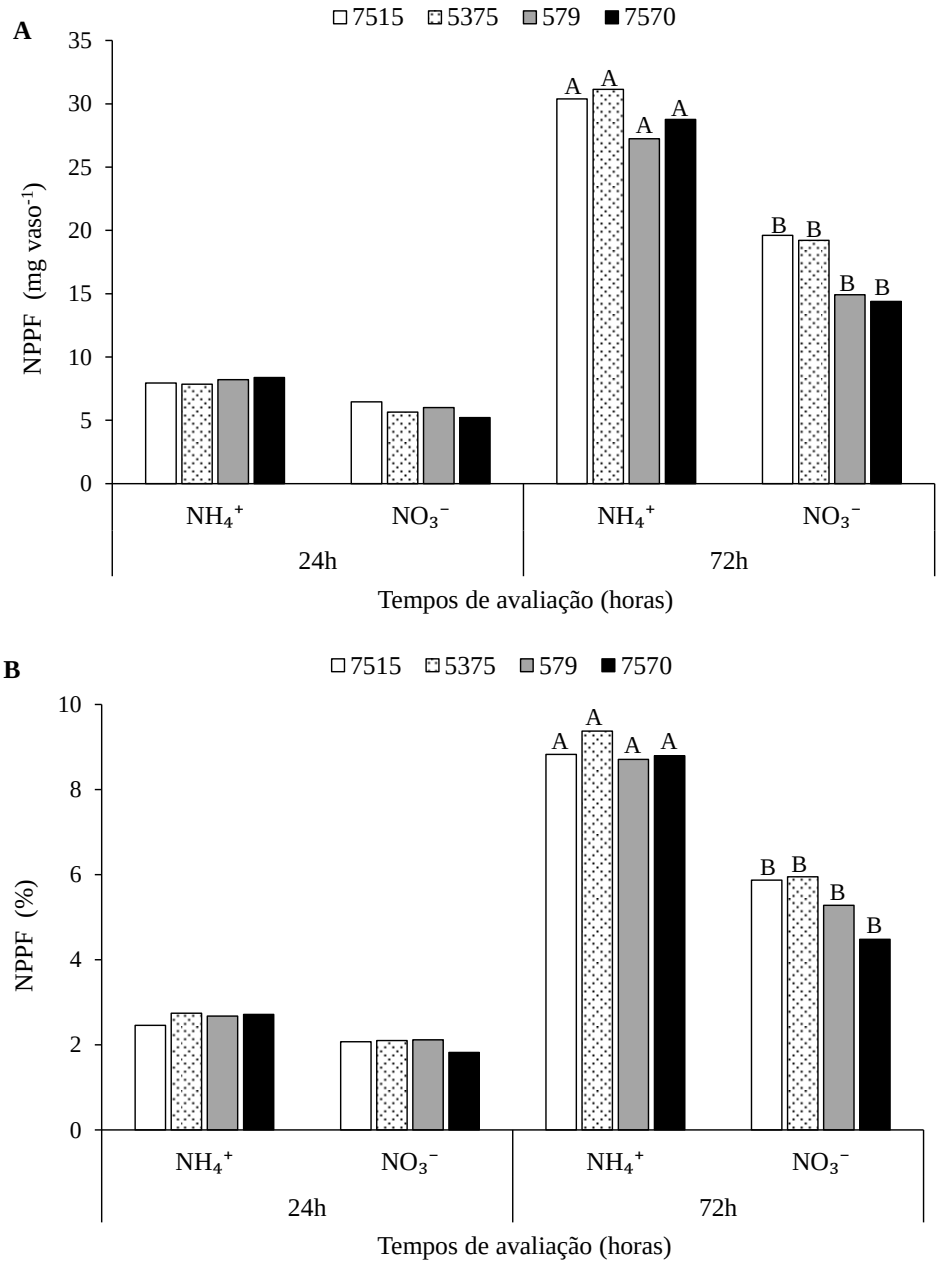


Figura 3.3. Nitrogênio total acumulado na planta proveniente do fertilizante (NPPF) em mg vaso^{-1} (A), e porcentagem (%) do N total da planta proveniente do fertilizante (B), em função da aplicação de N marcado em dois tempos de avaliação em genótipos contrastantes em EUN.

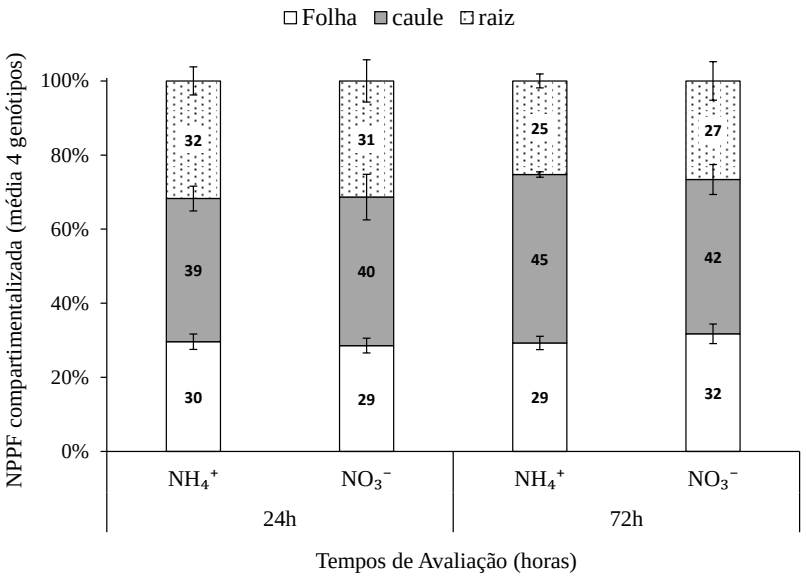


Figura 3.4. Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF) compartimentalizada em folhas, caules e raízes, média dos quatro genótipos, em função da aplicação de fontes de nitrogênio em dois tempos de avaliação.

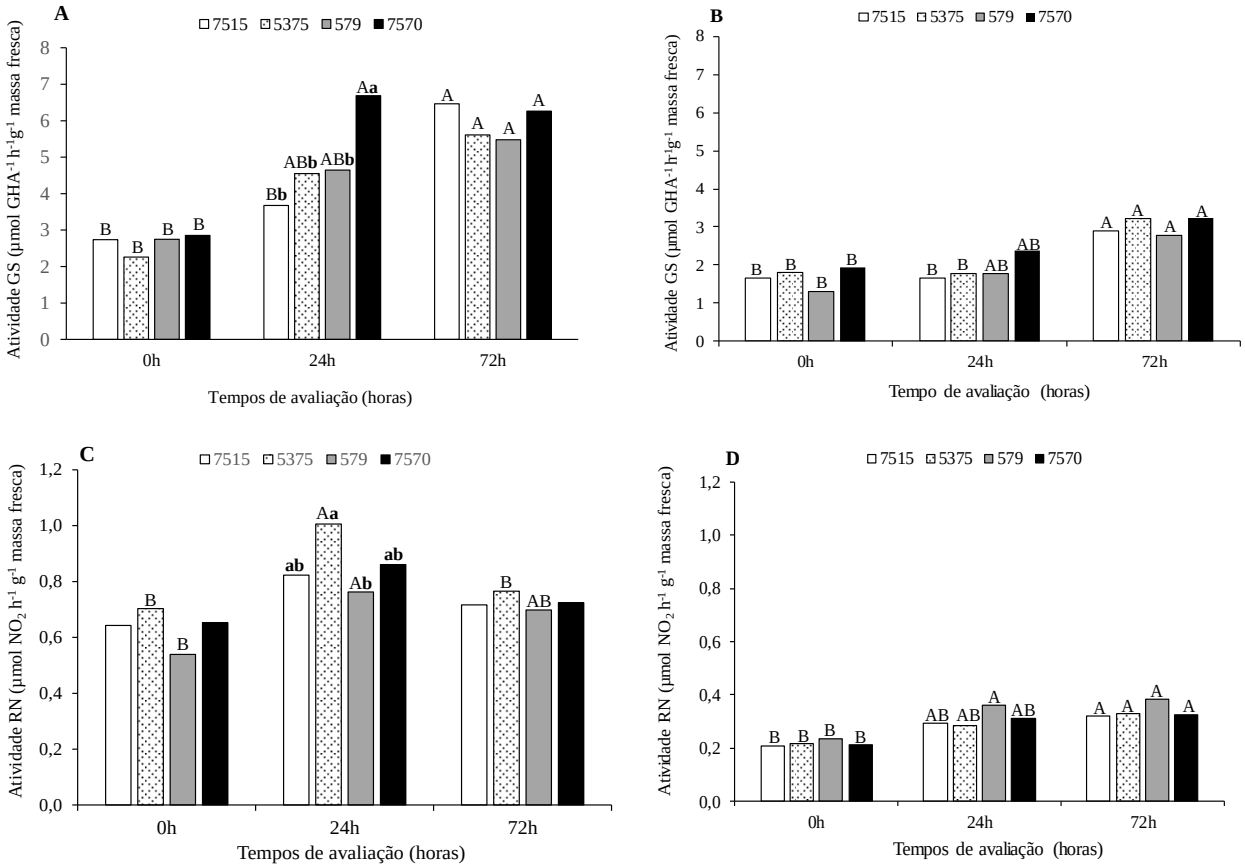


Figura 3.5. Atividade das enzimas glutamina sintetase (GS) nas folhas+1 (A) nas raízes (B), e atividade da redutase do nitrato (RN) nas folhas (C) e nas raízes (D) nos tempos de avaliação 0, 24 e 72 horas com genótipos contrastantes em EUN. Letras minúsculas comparam genótipos num mesmo tempo, Letras maiúsculas comparam cada genótipo entre os tempos.

3.4 Discussão

Considerando que o solo utilizado nesse experimento foi retirado da camada 0,00 – 0,20 m de um local que estava sob cultivo com cana-de-açúcar por um logo período, era esperado menores teores de N-NH_4^+, uma vez que solos da maioria das regiões do Brasil possuem elevado potencial de nitrificação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006), não conservando o N na forma amoniacal por longos período. Embora ainda não tenha sido quantificado nos solos do experimento, é provável que este solo tenha populações de bactérias e Arquéia oxidadoras de amônia, pois o N-NH_4^+ foi totalmente consumido depois da aplicação de NO_3NH_4 quando as plantas estavam com 30 dias. Koch et al. (2014) verificaram que a distribuição e a atividade dos microrganismos responsáveis pela nitrificação estão estritamente correlacionadas com as condições ambientais. Neste experimento as condições estavam altamente propicias para o seu desenvolvimento, com umidade ajustada para 65% da capacidade máxima de retenção e temperatura e umidade relativa controladas (24 – 30 ºC e 70 - 80% UR).

A ausência de N-NH_4^+ no momento da aplicação dos tratamentos também pode ser devido a maior absorção desse íon mesmo antes da aplicação dos tratamentos, pois o decaimento médio ocorrido nos teores de N-NH_4^+ entre os tempos *T24* e *T72* foi de 40%, enquanto que para os teores de N-NO_3^- foi de 25%. Esse maior decaimento nos teores de N-NH_4^+ após a aplicação do N marcado foi devido a maior absorção, pois para evitar a nitrificação utilizou-se dicianodiamida (DCD), dosagem de 10% da dose de N, em todos os vasos para ambas as fontes. A DCD tem ação bacteriostática e tem sido considerada muito eficiente na inibição do primeiro estágio da nitrificação (ZAMAN et al., 2009), sendo que estudos mostram que a reação de nitrificação ocorre após 5 dias da aplicação do fertilizante, e quando na presença de DCD o processo de nitrificação é retardado em 7 dias (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Embora os genótipos escolhidos para a realização desse experimento sejam bastante diferentes em relação a EUN, não foi observado diferença no acúmulo de MSPA nos tempos de avaliação *T0* e *T72*, isso pode ser devido ao fato de as plantas terem sido supridas com N após seu transplante para os vasos. Por outro lado, houve diferenças genotípicas em todos os tempos de avaliação *T0*, *T24* e *T72* para o acúmulo de MSR, com um padrão bem definido. O genótipo RB92579 com o pior desempenho em todos os tempos teve menor acúmulo de MSR que o genótipo RB867515, e os genótipos RB937570 e RB975375 os quais tiveram produção intermediária de raízes. Estes resultados estão confirmando os obtidos no capítulo dois dessa tese de doutorado, em que verificou-se que a eficiência de utilização de N está diretamente relacionada com a quantidade de raízes dos genótipos de cana-de-açúcar.

O genótipo RB92579 foi escolhido para ser testado nesse ensaio por ser considerado pouco eficiente e não responsivo a adubação nitrogenada, tendo apresentado os menores acúmulos de MSR. Robinson et al. (2011) verificaram diferenças no acúmulo de biomassa entre cinco espécies cultivadas com suficiência de N durante cinco semanas, sendo que a cana-de-açúcar comercial apresentou os maiores acúmulos em relação a *Saccharum spontaneum*, *Erianthus arundinaceus*, sorgo e milho. A cana-de-açúcar tem uma alta eficiência de conversão de luz e nutrientes em biomassa, sendo considerada uma planta que possui altas taxas fotossintéticas (ARUDA, 2011).

Em relação a fonte de N para a produção primária de cana-de-açúcar, Armas et al. (1992) verificaram diferenças no acúmulo de biomassa das plantas crescidas em meio com $N\text{-}NH_4^+$ ou $N\text{-}NO_3^-$, embora esses autores mantiveram as plantas crescendo por um período maior em contato com os íons, eles não forneceram ambas as fontes para os dois tratamentos, possivelmente pela indisponibilidade da técnica isotópica. Esse fato pode ter favorecido as plantas que cresceram na presença de $N\text{-}NH_4^+$, pois Salsac et al. (1987) relataram que a absorção e assimilação do $N\text{-}NH_4^+$ seria menos oneroso as plantas em comparação com $N\text{-}NO_3^-$. Por outro lado, fonte amoniacal sendo a única opção como fonte de N para a absorção em solução nutritiva pode causar graves sintomas de toxicidade nas plantas (DE GRAAF et al., 1998; BRITTO et al., 2001).

Com os resultados desse trabalho realizado com plantas de 3 meses, evidenciou-se que a cana-de-açúcar apresenta preferência de absorção por amônio ao invés de nitrato nos primeiros dias após a adubação. Os acúmulos de N na planta proveniente do fertilizante, na média dos quatro genótipos em 72 horas após a aplicação do N marcado, foram 31 e 42% menores na fonte NO_3^- para raízes e parte aérea respectivamente (Figura 3.2 A e B). Serezino (2015) avaliou os influxos de nitrato e amônio em plantas de cana-de-açúcar e verificou que, na condição de suficiência houve uma absorção de nitrato 98% menor em relação a absorção de amônio, diminuindo para 95% quando as plantas estavam em condição de limitação de N.

Ao contrário do que era esperado, não houve diferença entre os genótipos em relação ao NPPF na parte aérea em *T24* e *T72*, assim genótipos considerados muito eficientes como o RB975375 tiveram o mesmo NPPF que genótipos tidos como não eficientes como o RB92579. Porém em *T72* o NPPF na raiz teve diferenças entre os genótipos, evidenciando que a eficiência de utilização de N pode estar mesmo relacionada com as raízes, nesse caso, os genótipos RB975375 (eficiente responsivo) e RB867515 (não eficiente e responsivo) tiveram maior NPPF na raiz em relação ao RB92579 e RB937570.

Na literatura foram encontrados dois trabalhos que avaliaram a preferência de absorção de amônio efetivamente em cana-de-açúcar, embora o assunto tenha sido muito estudado em diversas outras espécies como arabidopsis (HELALI et al., 2010), morango (CARDENAS-NAVARRO et al., 2006) e arbóreas como pinus (BRONW et al., 2010). Armas et al. (1992) realizaram um experimento semelhante a deste trabalho, crescendo as plantas por um período de 5 meses (maior do que realizado em nosso trabalho), e só então transferiram as plantas para uma câmara de crescimento, aonde as mantiveram por 45 dias. No entanto esses autores não usaram a técnica isotópica e não forneceram as duas fontes de N para as plantas, mas sim uma ou outra, não permitindo que a planta mostrasse algum tipo de preferência por uma ou outra fonte. No trabalho desenvolvido por Robinson et al. (2011), obteve-se uma maior absorção de $N\text{-}NH_4^+$ em cana-de-açúcar, no entanto as medições dos influxos foram feitas num período muito curto, apenas minutos, após a aplicação do N. Estudos de influxos rápido (*Short-term Uptake*), de minutos após a aplicação do fertilizante comprovam a preferência de absorção por amônio (LOCUÉ et al., 2006). No entanto, podem haver diferenças em relação a estudos que tenham sido realizados com um maior período de exposição a fonte de N por exemplo.

Nossos resultados comprovaram que em 3 dias após aplicação do fertilizante marcado, o N estava presente nas diferentes partes da planta, sendo que de todo NPPF, em média 31% estava presente nas folhas, 43% nos caules e 26% nas raízes, enquanto que estudos de influxo rápido medem apenas o influxo unidirecional através da membrana celular, sem considerar se esse nitrogênio vai ser remobilizado. Em trabalho desenvolvido sobre cinética de absorção de N, Serezino (2015) comprovou por meio de ensaios de influxos rápido, que a cana-de-açúcar tem preferência de absorção por amônio, verificando também a presença do sistema de absorção de alta afinidade para nitrato e amônio: HATS (high affinity transportation system). Os HATS seriam induzidos quando o status de N na planta diminuem, ou quando as concentrações de N no substrato são baixas.

Vale ressaltar que o conceito de preferência de fontes de N não pode ser facilmente definido por depender de fatores ambientais (como temperatura e pH do solo) e fisiológicos (como interações entre o suprimento de carbono e crescimento em diferentes fontes de N, e interações entre a intensidade luminosa e as fontes de N) muito diversos e dinâmicos (BRITTO; KRONZUCKER, 2013). Além disso, os próprios íons NH_4^+ e NO_3^- interagem entre si e alguns estudos relatam um efeito sinergístico na assimilação de N e crescimento quando estes dois íons são combinados (COX; REISENAUER, 1973, KRONZUCKER et al., 1999), condição do presente experimento.

A atividade máxima da enzima GS nas folhas e raízes aumentaram entre os tempos de avaliação (0, 24 e 72 horas), sendo duas vezes superior em *T72* para todos os genótipos em relação a *T0*. Pelo fato da enzima GS possuir alta afinidade pelo amônio, pequenas quantidades do íon são suficientes para ativar seu mecanismo de atuação, evitando que a planta acumule quantidades tóxicas de NH_4^+ (BALOTF et al., 2015). De acordo com Sechley et al. (1992) em tecidos foliares ou clorofilados, são encontrados dois tipos da enzima GS, que estão localizadas no cloroplasto (GS2) e no citossol (GS1). A atividade da GS2 é responsável pela assimilação da amônia derivada da fotorrespiração e da redução de NO_3^- em tecidos fotossintéticos, enquanto a atividade da GS1 assimila amônia proveniente de fontes adicionais como biossíntese de fenilpropanóides, proteólise e remobilização de N (SECHLEY et al., 1992; SWARBRECK et al., 2011). Neste contexto, as medidas de atividade de GS obtidas neste experimento correspondem, em grande parte, à isoforma dos cloroplastos. Cinco genes que codificam a enzima GS já foram identificados em cana-de-açúcar (NOGUEIRA et al., 2005). Os resultados obtidos mostraram aumento significativo na atividade de GS a partir do momento da aplicação do fertilizante, que se manteve elevada até o final do experimento.

Não houve diferenças entre as atividades máximas da enzima RN nas raízes entre genótipos considerados eficientes e não eficientes na utilização do N. Esse fato pode ser explicado devido a atividade da enzima RN ser induzida pelas características do substrato (REDINBAUGH; CAMPBELL, 1991), que nesse caso foi o mesmo para todos os genótipos. Por outro lado, nas folhas em *T24* o genótipo RB975375, considerado eficiente e responsivo, apresentou atividade máxima maior da RN em relação aos genótipos RB92579 e RB867515. Donato et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes avaliando 5 genótipos de cana-de-açúcar cultivados *in vitro*. Porém, esses autores utilizam um método de avaliação *in vivo* conforme proposto por Jaworski (1971) e alcançam valores de atividade muito superiores à metodologia *in vitro* utilizada neste trabalho que utilizou metodologia de (WRAY; FIDO, 1990). Após 24 horas da aplicação do fertilizante, obteve-se as maiores atividades de RN na folha, decaindo em *T72*, devido a uma diminuição dos teores de NO_3^- no solo (Tabela 3.1), pois conforme verificado por Redinbaugh e Campbell (1991) a atividade dessa enzima está relacionada com a disponibilidade de NO_3^- no substrato.

A regulação da atividade e estabilidade das enzimas assimiladoras de N ocorre em múltiplos níveis, incluindo transcrição, tradução e modificações pós-traducionais, como interação com proteínas 14-3-3 e fosforilação (FINNEMANN; SCHJOERRING, 2000; MEYER; STITT, 2001; COMPAROT et al., 2003). A assimilação de N é intimamente ligada a atividade fotossintética e ao status global de carbono (C) da planta em um sistema complexo e

altamente regulado denominado balanço C:N (NUNES-NESI et al., 2010). Por este motivo, o maior desafio no estudo do metabolismo e utilização de N é o desenvolvimento de metodologia e abordagens para analisar esta rede metabólica complexa e as preferências das espécies.

A preferência de absorção por amônio em gramíneas passou a gerar bastante interesse a partir de 2011, com a publicação do trabalho de Robinson et al. (2011) que comprovaram que algumas espécies de Poacea, assim como a cana-de-açúcar, apresentam preferência de absorção por amônio ao invés de nitrato. Do ponto de vista prático para as condições brasileiras, há muitas discussões a respeito da importância dessa informação, pois é conhecido que solos tropicais possuem elevado potencial de nitrificação, se resumindo a semanas ou até mesmo em dias a presença de $N\text{-}NH_4$ no solo após a aplicação de fertilizantes amoniacais ou durante a mineralização de resíduos orgânicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os resultados desse trabalho com quatro genótipos de cana-de-açúcar contrastantes em EUN, confirmaram que a cana-de-açúcar apresenta preferência de absorção por amônio, nas primeiras horas após a aplicação do N-fertilizante. O grande benefício dessa informação está relacionado com a possibilidade de se adubar a cana-de-açúcar com fontes amoniacais e obter melhores aproveitamentos do N-fertilizante, pois mesmo sabendo que após um curto período todo o amônio no solo pode transformar-se em nitrato, a absorção inicial da cultura pode representar uma melhora no aproveitamento do N proveniente do fertilizante. Aditivamente, pode se pensar em utilizar inibidores de nitrificação para propiciar maior tempo de residência do amônio no solo, e assim contribuir para aumentar a eficiência de uso de N pela cana-de-açúcar.

3.5 Conclusões

Os quatro genótipos estudados apresentaram preferência de absorção pelo amônio ao invés de nitrato 72 horas após a aplicação do N-fertilizante, sendo observado uma remobilização desse N para folhas e caules.

Os genótipos não se diferenciaram em relação ao nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF), mesmo sendo genótipos com EUN totalmente contrastantes.

As atividades máximas das enzimas do metabolismo primário de N: glutamina sintetase (GS) e redutase do nitrato (RN) não tiveram diferenças entre os genótipos contrastantes em EUN.

Referências

ASSOCIAÇÃO NACIONAL PARA A DIFUSÃO DE ADUBOS - ANDA-. **Estatísticas.** Disponível em: <http://www.anda.org.br/> acesso em: 03 de jan. de 2016.

ARMAS, R.; VALADIER, M. H.; CHAMPIGNY, M. L.; LAMAZE, T. Influence of ammonium and nitrate on the growth and photosynthesis of sugarcane. **Journal of Plant Physiology,** Amsterdam, v. 140, p. 531-535, 1992.

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

BALOTF, S.; KAVOOSI, G.; KHOLDEBARIN, B. Nitrate reductase, nitrite reductase, glutamine synthetase, and glutamate synthase expression and activity in response to different nitrogen sources in nitrogen-starved wheat seedlings. **Biotechnology and Applied Biochemistry,** Hoboken, 2015. doi: 10.1002/bab.1362.

BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-46.

BOUDSOCQ, S.; NIBOYET, A.; LATA, J. C.; RAYNAUD, X.; LOEUILLE, N.; MATHIEU, J.; BLOUIN, M.; ABBADIE, L.; BAROT, S. Plant preference for ammonium versus nitrate: a neglected determinant of ecosystem functioning? **American Naturalist**, Chicago, v. 180, p. 60–69, 2012.

BOWN, E. H.; WATT, M. S.; CLINTON, P. W.; MASON, E. G. Influence of ammonium and nitrate supply on growth, dry matter partitioning, N uptake and photosynthetic capacity of *Pinus radiata* seedlings. **Trees,** New York, v. 24, p. 1097–1107, 2010.

BRADY, N. C.; WEIL. R. C. **The nature and properties of soils.** 13. ed. Prentice-Hall, Upper Saddle River, 2001.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. **Journal of Plant Physiology,** Amsterdam, v. 159, p. 567–584, 2002.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Nitrogen acquisition, PEP carboxylase, and cellular pH homeostasis: new views on old paradigms. **Plant, Cell & Environment,** New York, v. 28, p. 1396–1409, 2005.

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

BRITTO, D. T.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; KRONZUCKER, H. J. Futile transmembrane N cycling: a cellular hypothesis to 4 explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, DC, v. 98, p. 4255–4258, 2001.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.

CARDENAS-NAVARRO, R.; LOPEZ-PEREZ, L.; LOBIT, P. RUIZ-CORRO, R.; CASTELLANOS-MORALES, V. C.; Effects of nitrogen source on growth and development of strawberry plants. **Journal of Plant Nutrition,** New York, v. 29, p. 1699-1707, 2006.

CARNAÚBA, B. A. A. **Eficiência de utilização e efeito residual da uréia-15N em cana-de-açúcar (Saccharum spp.), em condições de campo.** 1989. 193 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

COMPAROT, S.; LINGIAH, G.; MARTIN, T. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 54, p. 595-604, 2003.

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

CRAWFORD, D. M.; CHALK, P. M. Sources of N uptake by wheat (*Triticum aestivum* L.) and N transformations in soil treated with a nitrification inhibitor (nitrapyrin). **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 149, n. 1, p. 59-72, 1993.

DE GRAAF, M. C. C.; BOBBINK, R. M.; ROELOFS, J. G.; VERBEEK, P. J. M. Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. **Plant Ecology**, Dordrecht, v. 135, p. 185–196, 1998.

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugarcane ans some other tropical grasses. **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 37, p. 191-196, 1972.

DONATO, V. M. T. S.; ANDRADE, A. G.; SOUZA, E. S.; FRANÇA, J. G. E.; MACIEL, G. A. Atividade enzimática em variedades de cana-de-açúcar cultivadas in vitro sob diferentes

níveis de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 39, n. 11, p. 1087-1093, 2004.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análises de solo.** 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA, CNPS, 1997. 212 p.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral nutrition of plants**: principles and perspectives. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2005. 380 p.

EVANS, R. D.; BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; EHLERINGER, J. R, nitrogen isotope composition of tomato (lycopersicon esculentum mill. Cv. T5) grown under ammonium or nitrate nutrition. **Plant Cell and Environment,** Nottingham, v. 19, p. 1317-1323, 1996.

FALKENGREN-GRERUP, U. Interspecies differences in the preference of ammonium and nitrate in vascular plants. **Oecologia,** Berlin, v. 102, p. 305-311, 1995.

FARQUHAR, G. D.; FIRTH, P. M.; WETSELAAR, R.; WEIR B. On the gaseous exchange of Ammonia between Leaves and the environment: determination of the ammonia compensation point. **Plant Physiology,** Rockville, v. 66, p. 710-714, 1980.

FENILLI, T. A. B.; REICHARDT, K.; TRIVELIN, P. C. O.; FAVARIN, J. L. Volatilization of Ammonia Derived from Fertilizer and Its Reabsorption by Coffee Plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis,** New York, v. 38, p. 1741-1751, 2007.

FINNEMANN, J.; SCHJOERRING, J. K. Post-translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. **The Plant Journal,** Oxford, v. 24, p. 171-181, 2000.

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 in Brazilian field conditions. **Field Crops Research,** Amsterdam, v. 121, p. 29-41, 2011.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Aproveitamento pela cana-de-açúcar da adubação nitrogenada de plantio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 2763-2770, 2008.

FRANK, D. A.; GROFFMAN, P. M. Plant rhizospheric N processes: what we don't know and why we should care. **Ecology,** Brooklyn, v. 90, p. 1512–1519, 2009.

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

GINÉ, M. F.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F. Simultaneous determination of nitate and nitrite by flows injection analysis. **Analytical Chimica Acta,** Amsterdam, v. 114, p. 191-197, 1980.

HARRISON, K. A.; BOL, R.; BARDGETT, R. D. Preferences for different nitrogen forms by coexisting plant species and soil microbes: comment. **Ecology,** Brooklyn, v. 88, p. 989–999, 2007.

HELALI, S. M.; NEBLI, H.; KADDOUR, R.; MAHMOUDI, H.; LACHAÂL, M.; OUERGHI, Z. Influence of nitrate ammonium ratio on growth and nutrition of Arabidopsis thaliana. **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 336, p. 65-74, 2010.

INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION - IFA. **Assessment of fertilizer use by crop at the global level.** Disponível em: <http://www.fertilizer.org/> Acesso em: 03 de jan. de 2016.

JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** New York, v. 43, p. 1274-1279, 1971.

KAHMEN, A.; WANEK, W.; BUCHMANN, N. Foliar δ15 N values characterize soil N cycling and reflect nitrate or ammonium preference of plants along a temperate grassland gradient. **Oecologia,** Berlin, v. 156, p. 861–870, 2008.

KOCH, H.; GALUSHKO, A.; ALBERTSEN, M.; SHINTLMEISTR A.; GRUBER-DORNINGER, C.; LÜCKER, S.; PELLETIER, E.; PASLIER, D.; SPIECK, E.; RICHTER, A.; NIELSEN, P. H.; WAGNER, M.; DAIMS, H. Growth of nitrite-oxidizing bacteria by aerobic hydrogen oxidation. **Science,** Washington, DC, v. 29, p. 1052-1054, 2014.

KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; KIRK, G. J. D. Nitrate-ammonium synergism in rice: a subcellular analysis. **Plant Physiology,** Rockville, v. 119, p. 1041-1046, 1999.

LEA, P. J.; BLACKWELL, R. D.; CHEN, F. L.; HECHT, U. Enzymes of ammonia assimilation. In: LEA, P. J. (Ed.). **Enzymes of primary metabolism**. London: Academic Press, 1990. p. 257-276. (Methods in Plant Biochemistry, 3).

MAIRE, V.; GROSS, N.; SILVEIRA PONTES L.; PICON-COCHARD, C.; SOUSSANA, J. F. Trade-off between root nitrogen acquisition and shoot nitrogen utilization across 13 co-occurring pasture grass species. **Functional Ecology,** London, v. 23, p. 668–679, 2009.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants.** 2. ed. London: Academic Press, 2008.

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

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

MENGEL, K.; ROBIN, P.; SALSAC, L. Nitrate reductase activity in shoots and roots of maize seedlings as affected by the form of nitrogen nutrition and the pH of the nutrient solution. **Plant Physiology,** Rockville, v. 71, p. 618-622, 1983.

MEYER, C.; STITT, M. Nitrate reduction and signalling. In: LEA, P. J.; MOROT-GAUDRY, J. F. (Ed.). **Plant nitrogen**. Heidleberg: Springer-Verlag, 2001. p. 37-59.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

NOGUEIRA, E. M.; OLIVARES, F. L.; JAPIASSU, J. C.; VILAR, C.; VINAGRE, F.; BALDANI, J. I.; HEMERLY, A. S. Characterization of lgutamine sunthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. **Plant Science,** Amsterdam, v. 169, p. 819-832, 2005.

NUNES-NESI, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpining the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant,** Oxford, v. 3, p. 973-996, 2010.

O´NEAL, D.; JOY, K. W. Glutamine synthetase of pea leaves. I. Purification, stabilization, and pH optima. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** New York, v. 159, p. 113-122, 1973.

OTTO, R.; FRANCO, H. C. J.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; TRIVELIN, P. C. O. Fitomassa de Raízes e da Parte Aérea da Cana-de-Açúcar Relacionada à Adubação Nitrogenada de Plantio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 44, n. 4, p. 398-405, 2009.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J. C. de; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. (Ed.). **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais.** Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Higher plant responses to environmental nitrate. **Physiologia Plantarum,** Copenhagen, v. 82, p. 640-650, 1991.

REIS, B. F.; VIEIRA, J. A.; KRUG, F. J.; GINÉ, M. F. Development of a flow injections system two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** São Paulo, v. 8, p. 523-528, 1997.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R.; SOPER, K. V. F.; GAMAGE, J. H. H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PloS One,** San Francisco, v. 6, n. 4, e19045, 2011.

SALSAC, L.; CHAILLOU, S.; MOROT-GAUDRY, J. F.; LESAINT, C.; JOLIVOE, E. Nitrate and ammonium nutrition in plants. **Plant Physiology and Biochemistry,** Paris, v. 25, p. 805–812, 1987.

SAMPAIO, E. V. S. B.; SALCEDO, I. H.; BETTAMY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência de utilização de uréia-^{15}N em aplicação única ou parcelada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** DF, v. 19, n. 8, p. 943-949, 1984.

SANCHEZ, J.; HELDT, W. H. On the regulation of spinach nitrate reductase. **Plant Physiology,** Rockville, v. 92, p. 684-689, 1990.

SCHULTZ, N.; MORAIS, R. F.; SILVA, J. A.; BAPTISTA, R. B.; OLIVEIRA, R. P.; LEITE, J. M.; PEREIRA, W.; CARNEIRO JÚNIOR, J. B.; ALVES, B. J. R.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Avaliação agronômica de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 47, p. 261-268, 2012.

SCHULTZ, N.; SILVA, J. A.; SOUSA, J. S.; MONTEIRO, R. C.; OLIVEIRA. R. P.; CHAVES, V. A.; PEREIRA, W.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. Inoculation of sugarcane with diazotrophic bacteria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 38, p. 407-414, 2014.

SECHLEY, K. A.; YAMADA, T.; OAKS, A. Compartimentation of nitrogen assimilation in higher plants. **International Review of Cytology,** New York, v. 134, p. 85-163, 1992.

SMITH, D. M.; INMAN-BAMBER, N. G.; THORBURN, P. J. Growth and function of the sugarcane root system. **Field Crops Research,** Amsterdam, v. 92, p. 169-183, 2005.

SWARBRECK, S. M.; DEFOIN-PLATEL, M.; HINDLE, M.; SAQUI, M.; HABASH, D. Z. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. **Journal of Experimental Botany,** Oxford, v. 62, p. 1511-1522, 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 e com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 26, p. 637-646, 2002a.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas de nitrogênio da ureia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v.37, n.2, p.193-201, 2002b.

TRIVELIN, P. C. O.; RODRIGUES, J. C. S.; VICTORIA, R. L. Utilização por soqueira de cana-de-açúcar de início de safra do nitrogênio da aquamônia-^{15}N e uréia-^{15}N aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 31, n. 2, p. 89-99, 1996.

TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L.; RODRIQUES, J. C. Aproveitamento por soqueira de cana-de-açúcar de final de safra do nitrogênio da aquamônia-^{15}N e aplicado ao solo em complemento à vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 30, n. 12, p. 1375-1385, 1995.

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

WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology,** Palo Alto, v. 52, p. 659–688, 2001.

WRAY, J. L.; FIDO, R. J. Nitrate reductase and nitrite reductase. . In: LEA, P. J. (Ed.). **Enzymes of primary metabolism**. London: Academic Press, 1990. p. 241-256. (Methods in Plant Biochemistry, 3).

YANEVA, I. A.; BAYDANOVA, V. D.; VUNKOVA-RADEVA, R. V. Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. **Journal of Plant Physiology,** Amsterdam, v. 157, p. 495-501, 2000.

ZAMAN, M.; SAGGAR, S.; BLENNERHASSETT, J. D.; SINGH, J. Effect of urease and nitrification inhibitors on N transformation, gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, pasture yield and N uptake ingrazed pasture system. **Soil Biology & Biochemistry,** Oxford, v. 41, p. 1270-1280, 2009.

4 AVALIAÇÃO DE EXTRATOS RADICULARES DE *Bracchiaria humidicola* E *Saccharum spontaneum* PARA O AUMENTO DO APROVEITAMENTO DO N EM CANA-DE-AÇÚCAR

Resumo

A manutenção do N mineral na forma de NH_4^+ no solo por um período mais longo é desejável para diminuir perdas e também porque existem evidências que a cana-de-açúcar tenha preferência pelo N-NH_4^+ ao invés N-NO_3^-. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de extratos radiculares de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* comparados ao inibidor DCD (Dicianoadiamida) para aumentar a absorção de N de plantas adubadas com sulfato de amônio, bem como quantificar a emissão dos fluxos de N_2O com a utilização desses inibidores. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos em quatro repetições: SA) sulfato de amônio (controle); SA+DCD) sulfato de amônio associado a aplicação de dicianodiamida; SA+BCH) sulfato de amônio associado a aplicação de extratos de raízes de *Brachiaria humidicola*; SA+SCS) sulfato de amônio associado a extratos radiculares de *Saccharum spontaneum*. Houve diferença na produção de biomassa da parte aérea aos 45 e 60 dias após a fertilização (DAF) e aos 15 e 60 dias para acúmulo de biomassa de raízes. Os maiores acúmulos foram verificados nos tratamentos SA+BCH e SA+SCS. A aplicação de SA associado ao inibidor sintético DCD manteve os valores de N-NO_3^- baixos ao longo do período de avaliação, enquanto que nos demais tratamentos houve aumento na concentração já a partir da segunda avaliação (15 DAF). As plantas de cana-de-açúcar não se beneficiaram da maior presença de N amoniacal promovida pelo DCD. O uso de DCD reduziu o fluxo médio de N_2O durante o período de avaliação em relação ao uso isolado do fertilizante, o que não foi observado com o uso de extratos de raízes de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum*. Compostos isolados dos extratos de raízes dentre eles gamma-aminobutirato (GABA), Succinato resultaram em maior produção de matéria seca de cana-de-açúcar, provavelmente devido a efeitos estimulantes de crescimento.

Palavras-chave: Amônio, nitrato, dicianodiamida, nitrificação

ROOT EXTRACTS OF *Brachiaria humidicola* AND *Saccharum spontaneum* TO INCREASE N USE BY SUGARCANE

Abstract

Retaining the mineral N in the form of NH_4^+ in the soil for a lengthy period is desirable for reducing losses. Furthermore, there is evidence that sugarcane prefers NH_4^+-N in place of NO_3^- N. This study aimed firstly, to evaluate the potential of root extracts of *Bracchiaria humidicola* and *Saccharum spontaneum*, in contrast with the DCD (Dicyandiamide) inhibitor, to increase absorption of N by plants fertilized with ammonium sulfate, and secondly, to quantify the emission of N_2O fluxes with the use of this inhibitor. The experiment was developed in a glasshouse in an entirely randomized design where four treatments were applied: AS) ammonium sulfate (control); AS+DCD) ammonium sulfate associated with dicyandiamide; AS+BCH) ammonium sulfate associated with root extracts of *Brachiaria humidicola*; and AS+SCS) ammonium sulfate associated with root extracts of *Saccharum spontaneum*. Differences were observed in biomass production in plants 45 and 60 days after fertilization (DAF) and 15 and 60 days in biomass accumulation of roots. The highest biomass production was found in treatments AS+BCH and AS+ SCS. The application of AS associated with DCD synthetic inhibitor kept NO_3^--N values low throughout the evaluation period, while in other treatments the concentration increased right up to the second evaluation 15 DAF. Sugarcane plants did not benefit from the increased presence of ammoniacal N promoted by DCD. The use of DCD reduced the average flux of N_2O during the evaluation period compared to plants receiving AS treatments only, which was not observed when root extracts of B. *humidicola* and S. *spontaneum* were used. Compounds isolated of extracts roots of them gamma-aminobutyrate (GABA), succinate resulted in higher dry matter yield of sugarcane, probably due to the growth stimulatory effects.

Key-words: Ammonium, nitrate, dicyandiamide, nitrification

4.1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma área cultivada de cerca de 8,4 milhões de hectares e uma produtividade média de 75 Mg ha^{-1} (FAO, 2014). No campo, apesar das conquistas numéricas obtidas, a produtividade dos canaviais encontra-se ainda muito aquém do potencial genético da cultura, estimado em valores superiores a 300 Mg ha^{-1} (WACLAWOVSKY et al., 2010). Além do caldo, principal matéria prima para produção de etanol, a cana-de-açúcar gera uma quantidade expressiva de subprodutos derivados de seu processamento como a palha e o bagaço, que podem servir tanto para obtenção do etanol de segunda geração (2G) quanto para cogeração de eletricidade, aumentando a competitividade e importância econômica da cultura (CARDOSO et al., 2013; DIAS et al., 2013).

Uma das alternativas para o aumento de produtividade da cultura de cana-de-açúcar é a realização do manejo adequado dos nutrientes, especialmente em relação ao nitrogênio (N). O N é um elemento essencial para a produção vegetal, e a absorção desse nutriente pela cana-de-açúcar varia de 100 até 300 kg ha^{-1} para a produção de 100 Mg ha^{-1} de colmos (CANTARELLA et al., 2007), e para tal, é imprescindível a aplicação de N-fertilizante nas soqueiras da cana-de-açúcar. O N presente nos resíduos vegetais (40 a 80 kg ha^{-1} de N) provenientes da colheita anterior de cana sem queima que permanece no solo pode representar uma importante fonte de N para a cultura durante o ciclo subsequente (VITTI et al., 2011; FORTES et al., 2012) e pode diminuir a necessidade de aplicação de fertilizantes minerais.

Porém, independente da dose de N-fertilizante empregada na lavoura de cana-de-açúcar, a eficiência de uso pela planta do N fornecido por fertilizantes é quase sempre menor que 50%, valor esse inferior ao observado na maioria das outras culturas, o qual varia de 50 a 70% (CANTARELLA et al., 2007; TRIVELIN; FRANCO, 2011). Diversos trabalhos demonstram que o aproveitamento do N-fertilizante aplicado em solos cultivados com cana-de-açúcar pode variar, em média, de 5 a 20% (PRASERTSAK et al., 2002; TRIVELIN et al., 2002a; FRANCO et al., 2011; VITTI et al., 2011). A grande variação e o baixo aproveitamento podem estar relacionados as perdas do N no sistema solo-planta. Essas perdas são oriundas dos processos de lixiviação do nitrato (NO_3^-) que deixa a região de exploração das raízes das plantas (OLIVEIRA et al., 1999), podendo ser perdido para atmosfera através do processo desnitrificação em condições de baixo suprimento de oxigênio (PIERZYNSKI et al., 2000), volatilização da amônia (NH_3) (TRIVELIN et al., 2002b), e perdas gasosas de nitrogênio (N_2O) pelo solo (CERRI et al., 2011) e pela parte aérea das plantas (FRANCO et al., 2008).

Além das perdas, o N na forma de NH_4^+, oriundo da ureia ou diretamente de fertilizantes amoniacais, em condições aeróbias, pode ser rapidamente nitrificado e transformando em nitrito (NO_2), por meio da ação bioquímica de bactérias do gênero Nitrossomonas. Na sequência, ocorre a oxidação do NO_2^- para nitrato (NO_3^-) que é mediada por bactérias como as do gênero Nitrobacter (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A manutenção do N mineral na forma de NH_4^+ durante maior período é preferível, pois, além de reduzir as perdas de N pelos fenômenos já citados.

Algumas plantas são capazes de inibir a nitrificação (LATA et al., 1999; 2004; SUBBARAO et al., 2007a; 2007b), isto é, a conversão microbiana de NH_4^+ em NO_3^-, alterando a quantidade relativa de NO_3^- e NH_4^+ disponível no solo, responsáveis pela nutrição com N das plantas. Boudsocq et al., (2009) relataram que tal inibição da nitrificação pode aumentar a produtividade primária e fertilidade do ecossistema de uma forma sustentável. A inibição melhora a conservação de N mineral no solo devido a diminuição da quantidade de NO_3^- propensa a perdas no ecossistema, como explicado acima, e também permite que a forma NH_4^+ seja adsorvida às cargas do solo.

Uma das estratégias utilizadas para conservar o N mineral na forma de NH_4^+ após a sua aplicação ou mineralização da matéria orgânica é por meio da utilização de inibidores de nitrificação. A Dicianodiamida (DCD), o qual tem ação bacteriostática e inibi o primeiro estágio da nitrificação, tem sido o produto mais utilizado com esta finalidade (CHIEN et al., 2009; ZAMAN et al., 2009). Por outro lado, há evidências de que a inibição da nitrificação ocorre naturalmente em solos agrícolas ou não cultivados, uma vez que algumas plantas produzem compostos com ação inibitória da nitrificação. Um dos gêneros mais tratados é o exemplo *Brachiaria* (SUBBARAO et al., 2007a). No Brasil, inúmeros trabalhos têm relacionado o cultivo ou a ocorrência de *Brachiaria* sp à predominância de N na forma amoniacal (CARMO et al., 2005; MORO et al., 2013; FERNANDES et al., 2011). É possível que o ancestral direto da cana-de-açúcar como a *Saccharum spontaneum* apresente mecanismo semelhante, já que, como mencionado , a cultura demonstra preferência na absorção de N como NH_4^+ ao invés NO_3^- (ROBINSON et al., 2011). A comprovação desse tipo de informação seria de grande valia ao melhoramento genético da cana-de-açúcar e pode contribuir ao entendimento da resposta limitada da cana à aplicação de N em algumas ocasiões.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de extratos radiculares de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* comparados ao inibidor DCD (Dicianomida) para aumentar a absorção de N de plantas adubadas com sulfato de amônio, bem como quantificar a emissão dos fluxos de N_2O com a utilização desses inibidores.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Caracterização e delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido na casa de vegetação do Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol (CTBE/CNPEM) em Campinas – SP, Brazil - (22º 48' 09" S, 47º 03' 11" O) e teve duração de 96 dias. O plantio das gemas de cana-de-açúcar ocorreu no dia 29/01/2014, sendo a última avaliação realizada em 06/05/2014. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. Para a realização de avaliações destrutivas instalaram-se cinco conjuntos de vasos para as cinco épocas de avaliações. Os tratamentos foram: SA) sulfato de amônio (300 mg N kg^{-1} - controle); SA+DCD) sulfato de amônio + dicianodiamida (5% da dose de N); SA+BCH) sulfato de amônio + extrato radicular de *Brachiaria humidicola*; SA+SCS) sulfato de amônio + extrato radicular de *Saccharum spontaneum*. A dose de extratos radiculares foi de 100 mL por vaso. Todo o N foi aplicado na forma de $(NH_4^+)_2SO_4$ e a dose foi elevada para forçar o processo de nitrificação.

Cada unidade experimental foi constituída de um pote (6 L) sem orifícios na base, preenchido com 5,5 kg de terra fina seca ao ar (TFSA) e peneirada com malha de 2 mm retirada de um Neossolo quartzanrênico (EMBRAPA, 2006). O solo foi retirado da camada superficial (0,00 – 0,20 m) de uma área cultivada com cana-de-açúcar por mais de 30 anos em sistema não mecanizado com queima prévia do canavial, tendo sido nos últimos oito anos colhida mecanicamente com preservação de resíduos sobre o solo. A caracterização químico-física do solo é apresentada na (Tabela 4.1).

A correção da acidez do solo e elevação dos teores de cálcio e magnésio foi realizada por meio da aplicação de calcário dolomítico (PRNT 90%) para atingir o índice de saturação por bases de 70% da CTC de acordo com o descrito em (RAIJ et al., 2001). Após a calagem, o solo foi incubado por 16 dias com a umidade ajustada para 70% da capacidade máxima de retenção de água.

Tabela 4.1 Características químicas e físicas do solo utilizado no experimento antes da calagem.

Prof	pH	C.O	$N\text{-}NO_3^-$	$N\text{-}NH_4^+$	P	S	K	Ca	Mg	CTC	V	Areia	Silte	argila
cm	$CaCl_2$	g dm^{-3}	------ g dm^{-3}-----		mg dm^{-3}		-----$mmol_c dm^{-3}$--------				%	--------g kg^{-1}----------		
0 - 20	5.2*	8	9.0	0.0	14	4	0,5	7	3	23	45	952**	23	25

*Análise realizada segundo metodologia de Raij (2001), **Análise realizada segundo metodologia da Embrapa, (1997). C.O: Carbono orgânico.

4.2.2 Condições de crescimento

As mudas da variedade RB855156 de cana-de-açúcar (mini toletes de uma gema e com 25 mm de comprimento) foram obtidas de colmos maduros de plantas cultivadas em condições de viveiro. As gemas extraídas foram germinadas e cultivadas por três semanas em vermiculita inerte desprovida de nutrientes. Posteriormente, cada planta foi transferida definitivamente para um pote plástico, onde houve suplementação com fósforo (50 mg kg^{-1} de solo), juntamente com 67% da dose recomendada de potássio (118 mg kg^{-1} de K) e 50% da necessidade de micronutrientes (3 mg kg^{-1} de Zn; 1 mg kg^{-1} de B; 0,5 mg kg^{-1} de Cu; 5 mg kg^{-1} de Fe; e 4 mg kg^{-1} de Mn), sete dias após a transferência, e N, 20 dias depois da transposição das mudas. O restante da dose de potássio e de micronutrientes foi administrado 40 dias após o transplante das mudas.

A obtenção dos extratos radiculares foi realizada de acordo com metodologia descrita em Gopalakrishnan et al. (2009), no qual 400 gramas de raízes frescas de *Brachiaria humidicola* ou *Saccharum spontaneum* foram lavadas em água corrente, colocadas em um recipiente, levemente maceradas com uso de uma espátula e colocadas em 2 L de água destilada por 36 horas sob temperatura de 20º C para a transferência dos exsudados para a solução. Após esse período, a solução foi filtrada em papel de filtro analítico e mantida refrigerada (2,5ºC) até o momento da aplicação. As plantas de *B. humidicola* foram obtidas de uma área que possui essa espécie por mais de 20 anos localizada no município de Bebedouro/SP, as raízes de *S. spontaneum* foram coletadas na estação de melhoramento do Centro de Tecnologia Canavieira - CTC em Camamu/Ba.

4.2.3 Avaliações realizadas

Para a avaliação dos tratamentos foram realizadas cinco avaliações da disponibilidade de $N\text{-}NO_3^-$ e $N\text{-}NH_4^+$ inorgânicos no solo, aos 7, 15, 30, 45 e 60 dias após a fertilização (DAF). As amostras, após coletadas, foram armazenadas imediatamente em freezer para diminuir a atividade microbiológica para que não se alterasse os teores de $N\text{-}NH_4^+$ e $N\text{-}NO_3^-$ no solo.

Para a extração das formas inorgânicas de N no solo uma amostra de 5 gramas de solo em base úmida e 25 mL de solução de KCl 2 mol L^{-1}, foram agitadas em mesa agitadora orbital por 1 hora, e filtradas em papel filtro analítico faixa azul. Posteriormente nos extratos foi determinado o N inorgânico por meio de sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA).

O $N\text{-}NH_4^+$ foi analisado em meio alcalino, passando por membrana hidrofóbica (PTFE), sendo o fluxo direcionado para uma cela de condutividade (REIS et al., 1997). As formas de N nítrico ($N\text{-}NO_3^-$ +$N\text{-}NO_2^-$) foram determinadas simultaneamente por método espectrofotométrico, mediante a redução do nitrato a nitrito em coluna de cádmio coperizado, seguida da reação do nitrito com sulfanilamida em meio ácido formando um azo composto (GINÉ et al., 1980). Os resultados de N mineral foram corrigidos e expressos em massa de terra seca em estufa (TSE), após a secagem de subamostras de solo em estufa a 105 ºC.

Em cada avaliação também foi determinado o *índice Spad* (SPAD), usando um aparelho clorofilômetro (Minolta SPAD-502, Konica Minolta, New Jersey, EUA), em que a medida da parcela foi obtida da média de 3 leituras da folha +1 com bainha visível; *altura das plantas* (AL), medida da base do colmo até a inserção da folha +1; *diâmetro das plantas* (DIA), medido no terço médio das plantas, além da determinação da biomassa seca da parte aérea e raízes e concentração de N dessas duas partes da planta após processamento. Para isso, as amostras de parte aérea e raízes foram secas em estufa de circulação forçada de ar a 65˚C, e subamostras foram submetidas a digestão sulfúrica e determinação de N total pelo método de Kjeldahl (NELSON; SOMMERS, 1973).

Metabólitos polares foram extraídos a partir de 100 µl de extrato de raízes de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* seguindo metodologia descrita por Giavalisco et al. (2011). Após extração, as amostras foram derivatizadas (LISEC et al., 2006) e analisadas por GC-MS (LECO Instruments). Os parâmetros de aquisição dos cromatogramas foram idênticos aos descritos por Weckwerth et al. (2004). Cromatogramas foram exportados do programa Leco ChromaTOF (version 3.25) para o programa R 2.12.2.

Detecção dos picos, alinhamento dos tempos de retenção, e busca em bibliotecas foram realizadas por meio do uso do pacote TargetSearch do Bioconductor (CUADROS-

INOSTROZA et al., 2009). Metabolitos foram quantificados pela intensidade do pico de uma massa selecionada que foi, posteriormente, por um padrão interno (sorbitol C13), sendo feita transformação logarítmica em base 2.

A emissão de N_2O foi avaliada durante todo o período experimental. Para isso foram desenvolvidas câmaras de amostragem as quais foram posicionadas dentro de cada vaso do último grupo de recipientes a serem desmontados 60 dias após a aplicação dos tratamentos. As câmaras foram constituídas de duas partes: uma base de PVC com 5 cm de diâmetro e 15 cm de altura e uma tampa confeccionada com tampas de PVC de 5 cm de diâmetro. A tampa foi furada e um septo de borracha butílica (22,5 mm) foi perfeitamente ajustado de modo que evitasse qualquer vazamento de gás (fotos apêndices C). As câmaras apresentavam um volume mínimo de aproximadamente 0,2 dm^3. As bases foram fixadas ao solo ao lado da planta de cana-de-açúcar e permaneceram abertas, exceto durante a amostragem. As amostragens para análise de fluxos de N_2O foram diárias no primeiro mês de avaliação e ocorreram em dias alternados no segundo mês. Para isso, as bases eram fechadas com a tampa perfeitamente ajustada evitando-se qualquer vazamento, e uma amostra de gás (20 mL) acumulada após 30 minutos foi removida através dos septos e armazenada em frascos Exetainer (12 mL; Labco Inc., UK). De modo a determinar a concentração de N_2O no ambiente no momento do fechamento da câmara (*t0),* foram determinados quatro amostras do ar da casa de vegetação realizadas simultaneamente às coletas feitas nas parcelas experimentais. A concentração de N_2O foi analisada por cromatografia gasosa com arraste com Hélio – He num sistema sem injeção automática de amostras (Modelo GC 2014, Shimadizu Co., Japão) e determinação da concentração de N_2O por meio de um detector de captura de elétrons (ECD) operando a 325°C. Maiores detalhes do sistema de cromatografia gasosa podem ser obtidos no trabalho de Vargas et al. (2014).

O fluxo de cada gás (µmol mol h^{-1}) foi calculado como o incremento/decréscimo linear na concentração dentro de cada câmara com o tempo de coleta das amostras como sugerido por Livingston; Hutchinson (1995). Os fluxos são corrigidos de acordo com a temperatura e a pressão atmosférica do dia dentro da casa de vegetação, conforme a seguinte equação (JANTALIA et al., 2008):

$$f = \frac{CC_{t30} - C_{t0}}{\Delta t} * \frac{V}{A} * \frac{m}{V_m}$$

em que: f é o fluxo de cada gás; $\frac{\Delta C}{\Delta t}$ é a variação da concentração de cada gás dentro das câmaras no tempo que permaneceram fechadas (30 minutos); *V* e *A* são respectivamente o volume e a

área da câmara; *m* é o massa molar de cada gás e *Vm* é o volume molar do N_2O na temperatura de amostragem. Os fluxos foram expressos em µg N m^{-2} d^{-1}. Estimativas da emissão cumulativa de cada um dos gases foram realizadas por meio da interpolação linear entre os fluxos diários das datas de amostragem adjacentes, considerando o intervalo entre amostragens.

A umidade do solo foi corrigida diariamente a 70% da capacidade máxima de retenção por meio de pesagens. Os vasos onde foram posicionadas as câmaras para amostragem da emissão de N_2O também foram pesados e a umidade na base da câmara foi corrigida de acordo com a sua área com a utilização de uma seringa. Essa operação sempre foi realizada após a coleta dos gases. Durante o período experimental, a umidade relativa do ar e a temperatura dentro da casa-de-vegetação foram registradas a cada hora por meio de um dataloger. A temperatura média durante o período experimental foi de 24ºC e a umidade relativa de 80% (Figura 4.1).

As análises estatísticas foram realizadas com o programa SISVAR (versão 5.6, UFLA, Lavras, MG). Inicialmente realizou-se a análise de variância (ANOVA) e verificação de significância pelo teste F a 5%, paras as variáveis que apresentaram significância as médias foram comparadas com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

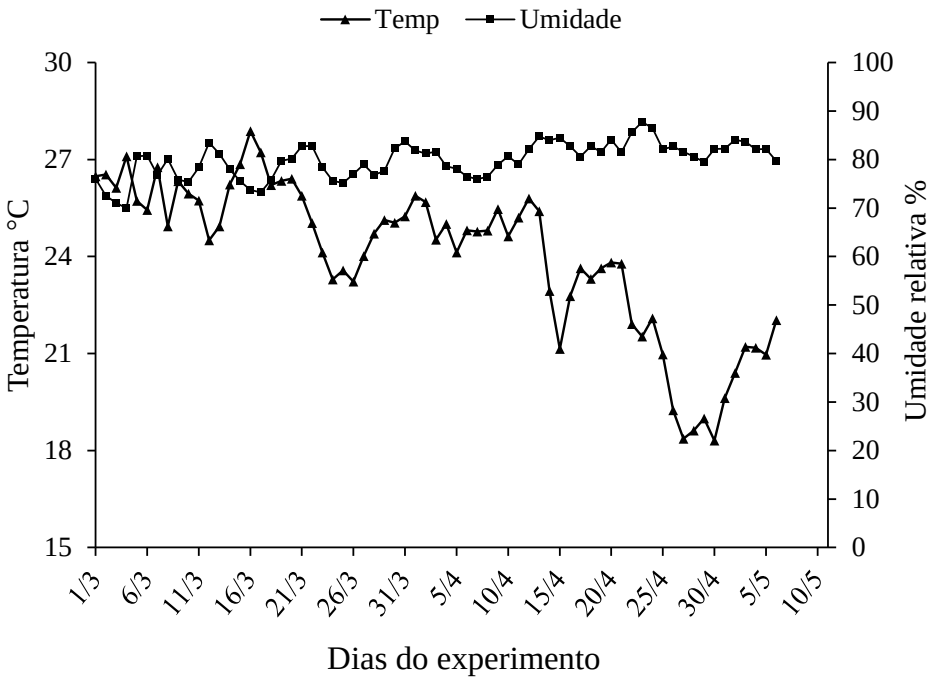


Figura 4.1. Temperatura e umidade no período de condução do experimento

4.3 Resultados

4.3.1 Parâmetros biométricos e acúmulo de biomassa e N nas plantas

A aplicação de sulfato de amônio associado aos inibidores de nitrificação dicianodiamida (DCD), extratos de raízes de *Brachiaria humidicola* (BCH) e extratos de raízes de *Saccharum spontaneum* (SCS) não aumentaram a altura e diâmetro das plantas na maioria das épocas avaliadas (Tabela 4.2). Aos 15 e aos 30 DAF, a aplicação de BCH com o sulfato de amônio teve efeito superior ao controle (SA) em relação à altura. Já aos 45 DAF, as plantas do controle apresentaram menor diâmetro que as plantas tratadas com os dois extratos radiculares, mas não diferiram das plantas que receberam DCD como inibidor de nitrificação.

Tabela 4.2 Altura (AL) e diâmetro (D) das plantas em função da aplicação de sulfato de amônio com ou sem inibidores de nitrificação.

TRAT	Dias após a fertilização (DAF)											
	0		***7***		***15***		***30***		***45***		***60***	
	AL	D	AL	D	AL	D	AL	D	AL	D	AL	D
	cm	mm	cm	mm	cm	mm	cm	mm	cm	mm	cm	mm
SA	10,5	3,5	10,8	3,1	15,8 bc	5,1	15,7 b	6,0	26,5	8,1 b	23,2	10,3
SA+DCD	10,1	4,0	12,3	3,6	13,1 ab	4,6	21,2 a	7,3	24,7	8,9 ab	23,7	10,5
SA+ BQH	10,3	2,7	11,4	3,6	17,0 a	4,9	20,9 a	7,6	23,8	10,3 a	24,0	10,4
SA+SCS	10,9	4,4	11,4	3,8	12,4 c	5,3	21,7 a	7,7	25,4	10,0 a	26,7	11,6
DMS	1,9	1,3	2,8	1,4	2,9	0,7	3,9	1,5	5,1	1,4	3,7	1,2
P<0,05	ns	ns	ns	ns	*	ns	*	ns	ns	*	ns	ns

SA: Sulfato de amônio; DCD: dicianodiamida; BCH: Extrato radicular de *Brachiaria humidicola*; SCS: extrato radicular de *Saccharum spontaneum*; DMS: diferença mínima significativa; p<0,05: significativo a 5% de probabilidade teste Tukey;

Houve diferença significativa entre os tratamentos para o acúmulo de biomassa na parte aérea (PA) aos 45 e 60 DAF e para o acúmulo de biomassa nas raízes aos 15 e 60 DAF (Figura 4.3). Em relação ao acúmulo de biomassa na parte aérea, o SA+BCH superou o SA e SA+DCD aos 45 DAF. Já, aos 60 DAF, SA+SCS foi superior ao SA+DCD sem diferir de SA e SA+BCH (Figura 4.2). O tratamento com maior produção de raízes foi o SA+BCH, superior ao SA e SA+DCD aos 15 DAF e superior ao SA+DCD aos 60 DAF.

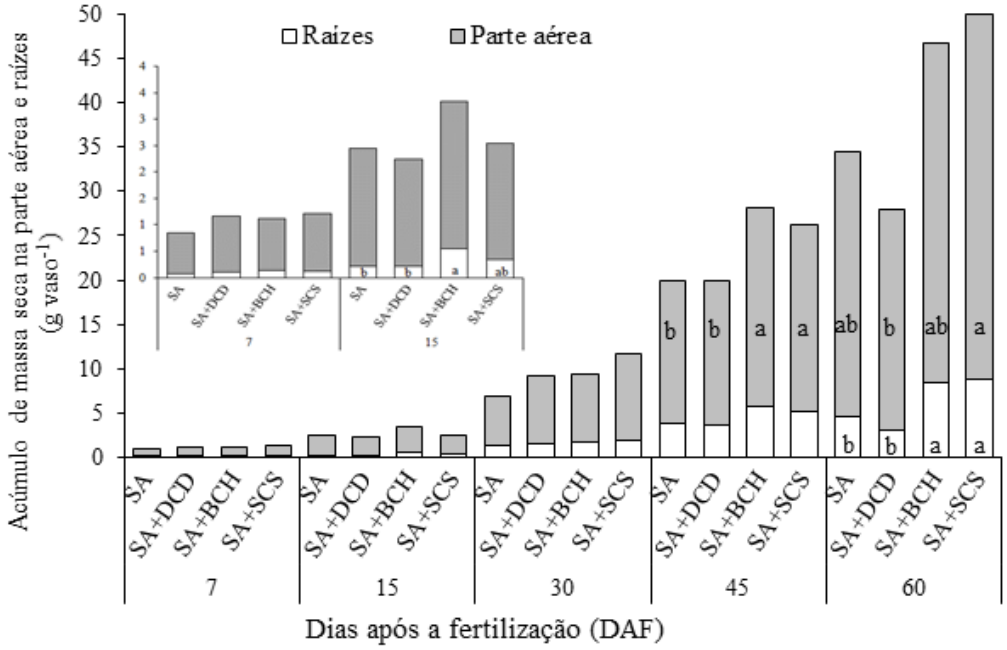


Figure 4.2. Acúmulo de massa seca na parte aérea e nas raízes relacionado a aplicação de SA: Sulfato de Amônio; DCD: dicianodiamida; BCH: Extrato de raízes de *Brachiaria humidicola*; SCS: Extrato de raízes de *Saccharum spontaneum*.

Aos 7 DAF, a concentração de N na parte aérea das plantas foi menor nos tratamentos SA+BCH e SA+SCS. A aplicação de DCD junto à fonte de N aumentou o teor de N na parte aérea, e no sistema radicular da cana-de-açúcar (Tabela 4.3). Entretanto, a maior concentração não aumentou o acúmulo do nutriente, independentemente do tecido, em função do menor acúmulo de biomassa ao se utilizar o inibidor de nitrificação comercial.

A concentração de N na PA reduziu com o decorrer do período experimental, com exceção da avaliação realizada aos 30 DAF. Opostamente, a concentração de N nas raízes aumento no decorrer desse mesmo período (Tabela 4.3). A média geral da concentração de N na PA foi de 40,9; 38,2; 45,7; 37,1 e 34,3 g kg^{-1} e nas raízes de 24,6; 30,6; 34,9; 31,0 e 39,5 g kg^{-1} para as avalições realizadas aos 7, 15, 30, 45 e 60 DAF, respectivamente.

Tabela 4.3 Teor e acúmulo de N na parte aérea de cana-de-açúcar em função da aplicação de sulfato de amônio com ou sem inibidores de nitrificação.

Trat	Dias após a fertilização (DAF)									
	7		15		30		45		60	
	N [ ]	N Acu.	N [ ]	N Acu.	N [ ]	N Acu.	N [ ]	N Acu.	N [ ]	N Acu.
	g kg^{-1}	mg pot^{-1}	g kg^{-1}	mg pot^{-1}	g kg^{-1}	mg pot^{-1}	g kg^{-1}	mg pot^{-1}	g kg^{-1}	mg pot^{-1}
Parte aérea										
SA	45,9 a	35,2	40,5	90,2	47,9	278,8	36,7	602,0	34,8 b	1037,6
SA+DCD	44,3 ab	46,1	37,9	75,7	48,9	353,1	37,8	613,2	40,0 a	1003,2
SA+ BCH	35,5 b	34,9	37,5	104,4	46,4	369,7	36,7	825,7	31,2 b	1164,0
SA+SCS	38,1 b	41,6	36,9	80,0	39,8	390,3	37,2	780,6	31,3 b	1273,5
DMS	10,2	12,3	5,6	33,3	19,1	223	6,2	199,2	6,1	438,0
CV	15,6	19,5	30,1	23,7	26,1	40,0	10,5	17,6	11,2	24,8
P<0.05	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns
Raízes										
SA	22,9	1,97	21,3	4,5 b	36,9	44,8	34,0	129,2	43,5 ab	195,1 bc
SA+DCD	19,9	2,29	32,9	8,1 b	35,7	47,4	30,5	108,3	45,3 a	130,5 c
SA+ BCH	23,8	3,52	34,9	19,7 a	36,7	59,8	27,2	155,6	37,0 ab	294,4 a
SA+SCS	20,6	2,45	33,2	12,3 ab	30,4	55,6	32,6	155,1	33,2 b	276,6 ab
DMS	6,7	2,25	12,7	9,0	10,0	35,6	11,7	86,1	11,2	94,4
CV	19,2	55,2	25,9	50,7	17,9	42,8	23,64	39,3	17,7	26,3
P<0,05	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	*

SA: Sulfato de amônio; DCD: dicianodiamida; BCH: Extrato radicular de *Brachiaria humidicola*; SCS: extrato radicular de *Saccharum spontaneum*; N [ ]: concentração de N (g kg^{-1}); N Acu.: Acúmulo de N; DMS: diferença mínima significativa; p<0,05: significativo a 5% de probabilidade teste Tukey; CV: Coeficiente de variação;

4.3.2 Disponibilidade de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo

Aos 7 DAF um pico superior a 250 mg N-NH_4^+ kg^{-1} de solo relacionado a aplicação dos 300 mg N kg^{-1} de solo foi registrado para todos os tratamentos (Figura 4.3). Posteriormente verificou-se um decréscimo linear na concentração de N-NH_4^+ no solo. No final do período de avaliação, o teor de NH_4^+ no solo dos vasos que receberam o tratamento SA+DCD foi quase duas vezes maior que o teor no controle, indicando uma passagem mais gradual do NH_4^+ a NO_3^- e evidenciando uma inibição no processo de nitrificação do NH_4^+ proveniente do fertilizante. Tal inibição não foi detectada com o uso dos extratos de raízes de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum*, tendo em vista que para ambos os tratamentos os teores de NH_4^+ foram similares ao controle durante todo o período de avaliação. Os teores de NO_3^- comportaram-se de maneira inversa: maiores teores foram constatados no período intermediário para os

tratamentos SA+BCH e SA+SCS (30 DAF) alcançando o pico aos 45 DAF no SA. No final do período experimental os teores foram semelhantes entre si. SA+DCD, SA+BCH e SA+SCS respectivamente (Figura 4.4).

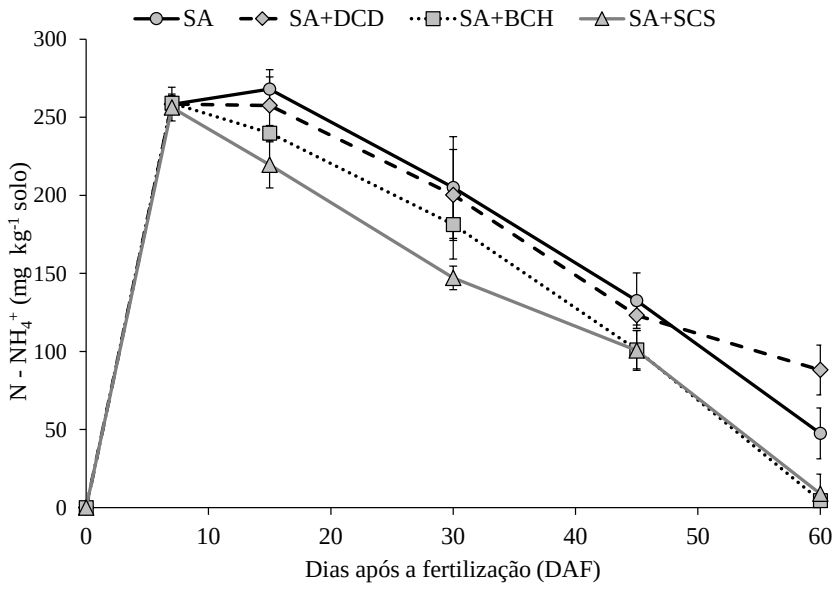


Figura 4.3. Disponibilidade de N–NH4$^+$ no solo durante os 60 dias de experimento em função dos tratamentos SA: sulfato de amônio; DCD: dicianodiamida; BCH: extrato de raízes de *Brachiaria humidicola*; SCS: extrato de raízes de *Saccharum spontaneum*.

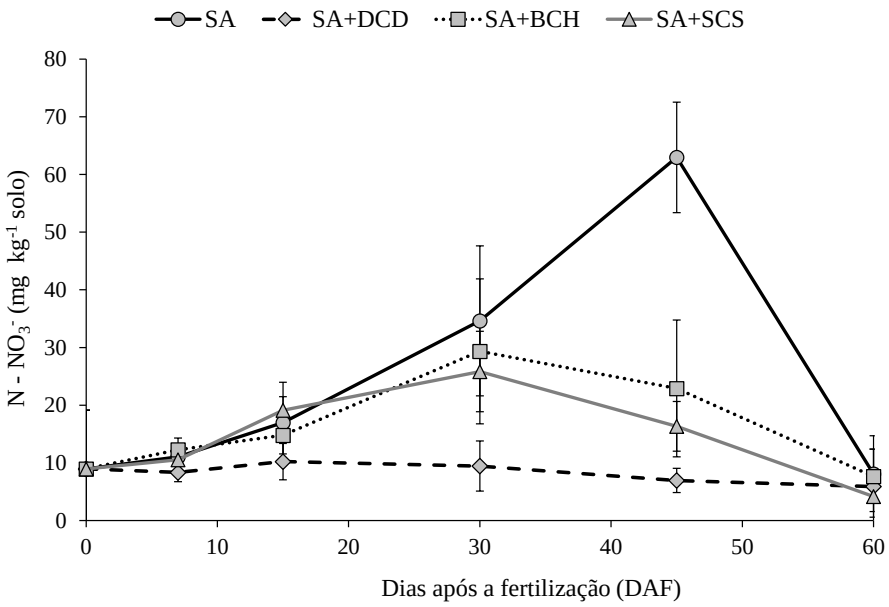


Figura 4.4. Disponibilidade de N–NO$_3^-$ no solo durante os 60 dias de experimento em função dos tratamentos; SA: sulfato de amônio; DCD: dicianodiamida; BCH: extrato de raízes de *Brachiaria humidicola*; SCS: extrato de raízes de *Saccharum spontaneum*.

4.3.3 Fluxos de N_2O relacionado a aplicação de inibidores de nitrificação

Apesar de o ensaio ter sido conduzido em ambiente semi-controlado, os fluxos de N_2O apresentaram oscilação temporal em função da variação diária da temperatura. Fluxos negativos, indicando consumo de N_2O pelo solo, também foram registrados. Nos 60 dias de avaliação que seguiram a aplicação do fertilizante nitrogenado, associado ou não ao DCD e aos extratos radiculares, os fluxos de N_2O oscilaram entre <0,1 a 3,4; 0,1 a 1,4; <0,1 a 3,4; e <0,1 a 1,9 mg N-N_2O m^{-2} d^{-1}, respectivamente, nos tratamentos SA, SA+DCD, SA+BCH, e SA+SCS (Figura 4.5). Considerando-se as perdas acumuladas de N como N_2O, a maior emissão foi verificada a partir de vasos fertilizados com sulfato de amônio isoladamente e quando o fertilizante foi associado ao extrato de *B. humidicola* (SA+BCH). Nesses casos, a emissão de N_2O ultrapassou 60 μg m^2 na última avaliação realizada aos 60 DAF. Por outro lado, o uso de DCD associado ao sulfato de amônio reduziu a emissão de N_2O em 57,3% em relação ao uso isolado do fertilizante nitrogenado (Figura 4.6).

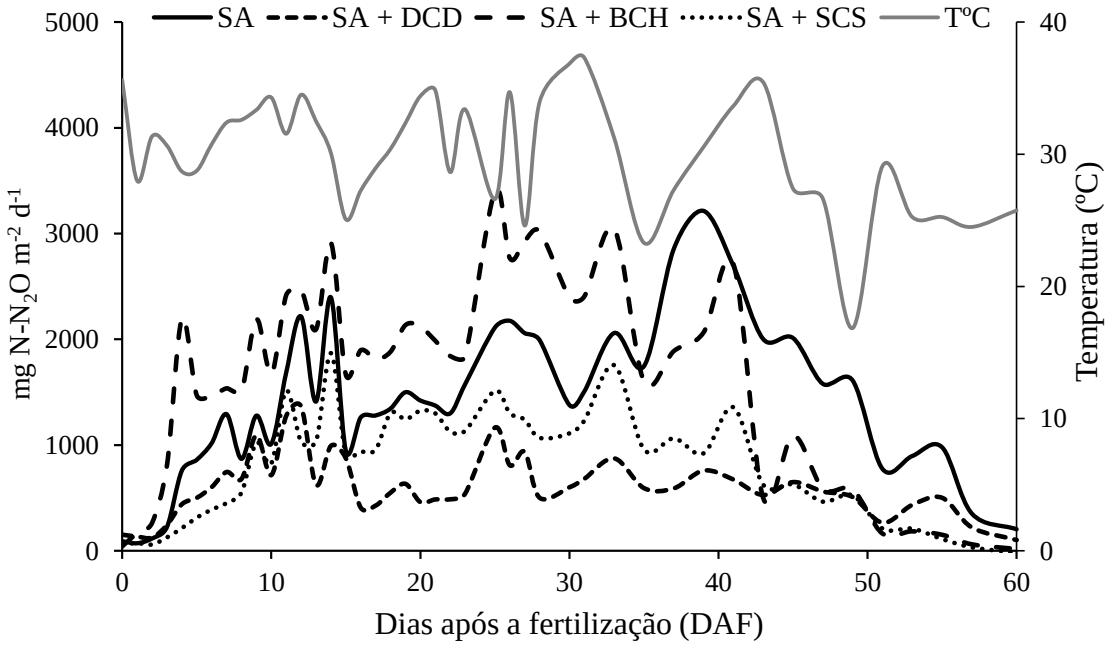


Figura 4.5. Emissão diária de N_2O e temperatura do ar em função da aplicação de sulfato de amônio, e sulfato de amônio associado a DCD: dicianodiamida; BCH: extrato de raízes de *Brachiaria humidicola*; e SCS: extrato de raízes de *Saccharum spontaneum*.

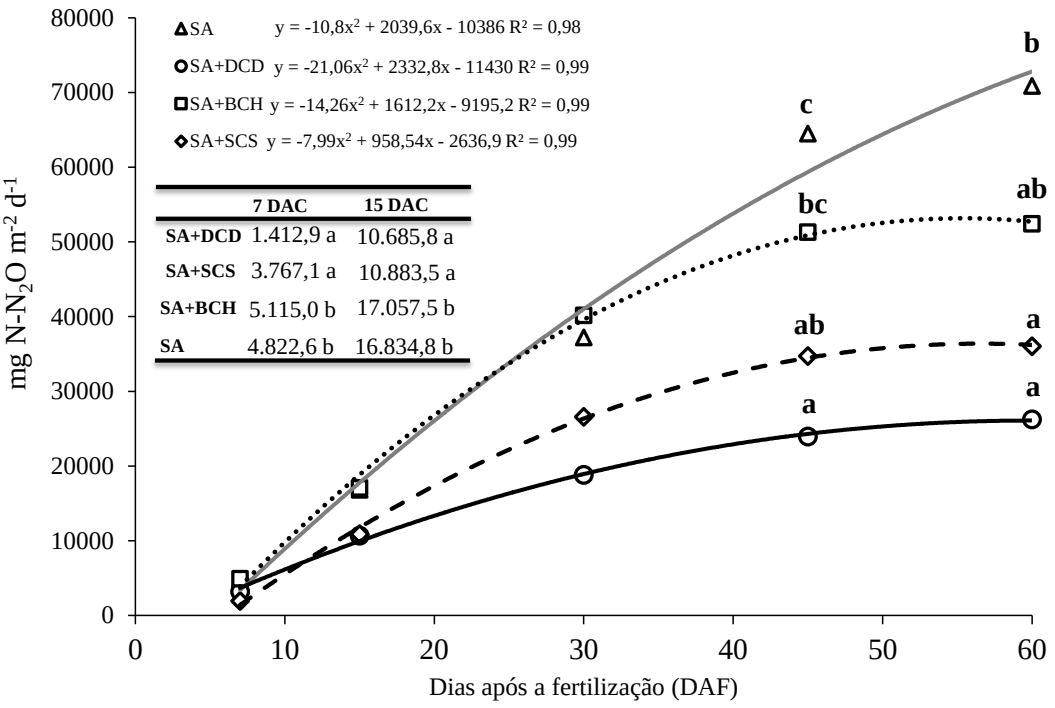


Figura 4.6. Perda de acumulada de N-N_2O do solo em função da aplicação de sulfato de amônio, e sulfato de amônio associado a DCD: dicianodiamida; BCH: extrato de raízes de *Brachiaria humidicola*; e SCS: extrato de raízes de *Saccharum spontaneum*.

Foram encontrados cerca de 45 metabolitos secundários nos extratos de *B humidicola* e *S spontaneum*, no entanto em concentrações muito semelhantes para os dois extratos, dentre eles metabólitos que podem estar relacionados a promoção de crescimento como é o caso de gamma-aminobutirato e succinato (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Metabólitos polares encontrados nos extratos de *B. humidicola* e *S. spontaneum.*

Met ID	Extrato BCH Log 2	Extrato SCS Log 2	Met ID	Extrato BCH Log 2	Extrato SCS Log 2
2-Hydroxypyridine	14,51	14,85	Glutamate	10,36	11,19
Acetate	14,93	15,53	C5H10O5 [Ribulose|Xylulose]	9,89	7,59
Glycerol	15,93	16,60	(r|x) Putrescine	16,14	15,93
Isoleucine	NA	12,72	(r|x) Dodecanoate	13,42	13,44
Glycine	12,99	13,91	Phenylalanine	9,15	10,70
Orthophosphate	15,12	14,07	Ribonate	10,62	10,05
Benzoate	13,60	14,20	4-Hydroxybenzoate	13,93	12,56
Succinate	11,36	10,84	Arabinono-1.4-lactone	10,28	7,74
(r|z) Riboflavin	17,50	15,90	2-Aminoadipat	10,69	NA
Phenylacetate	8,89	7,63	(r|x) 1.5-Diaminopentane	15,67	12,34
Nicotinate	11,37	9,18	Suberate	9,80	9,71
b-Alanine	12,17	10,46	Ornithine	11,03	11,68
Erythrose	11,66	8,99	Tridecanoate	9,96	10,01
C4H10O4 [Erythritol|Threitol]	12,10	10,74	Quinate	10,24	10,01
Citramalate	9,70	7,95	C6H12O6 [Mannose|Allose]	17,10	17,58
Decanoate	12,23	12,72	Citrate	14,53	9,41
Malate	10,93	9,73	Glucose	NA	11,48
4-Aminobutanoate	13,97	10,64	Putrescine	10,94	9,84
Threonate	8,40	7,63	Tetradecanoate	14,97	15,55
Deoxyribose	11,00	10,06	myo-Inositol	16,03	9,25
Adipate	11,92	NA	4-Coumarate	11,56	11,53
1.3-Diaminopropane	13,33	11,14	Heptadecanoate	13,71	14,30
3-Hydroxybenzoate	9,98	11,12	Sucrose	12,54	12,35
5-Oxoproline	15,69	15,23			

4.4 Discussão

Subarao et al. (2007a) testaram o efeito inibitório de exsudatos radiculares de 18 espécies de plantas e encontraram efeitos positivos em sorgo, milheto e amendoim; entre as gramíneas forrageiras, a inibição de nitrificação mais pronunciada foi encontrada em *B. decumbens* e *B humidicola*. Cana-de-açúcar não foi incluída naquele estudo. Como a cana-de-açúcar mostra evidências de ter preferência pela absorção de N-NH_4^+, é possível que suas raízes também produzam compostos que preservem essa forma química de N no solo. *S. spontaneum*, uma das espécies que compõem os híbridos atualmente cultivados de cana-de-açúcar, contribui principalmente por conferir rusticidade e sistema radicular abundante

(MATSUOKA; GARCIA, 2011) e pode ser uma possível fonte dessa característica. Amplamente cultivadas no cerrado brasileiro, pastagens de *B. humidicola* e *B. decumbens* são altamente adaptadas para condições com baixa disponibilidade de N. Nesse sentido, assim como o relatado por Subarao et al. (2007a), é possível que espécies mais bem adaptadas ao cerrado apresentem mecanismos para conservar e utilizar de forma eficiente o N, principal fator limitante para o crescimento e reprodução (LATA et al., 2004).

Subbarao et al. (2009) foram capazes de isolar um inibidor de nitrificação eficaz (brachialactana) de exudatos radiculares de *B. humidicola*. Gopalakrishnan et al. (2009) também reportaram diminuição na nitrificação de 29% com a aplicação de 182 mg N – $(NH_4)_2SO_4$ kg solo^{-1} associado a aplicação de exsudatos de *Brachiaria humidicola*.

Embora o presente estudo não tenha sido desenhado para medir o efeito inibidor de nitrificação de *B humidicola* e *S spontaneum*, o teor de N-NO_3^- no solo 45 dias após a aplicação de sulfato de amônio contendo DCD ou o extrato das duas espécies de gramínea era menor do que o observado no tratamento controle, apenas com o fertilizante nitrogenado (Figura 4.4). Porém, o efeito inibidor, se houve, foi menor do que o da DCD, o qual manteve os teores de nitrato no solo em torno de 10 mg N kg^{-1} durante todo o período, ao passo que os extratos de raízes de gramíneas não se mostraram tão efetivos nas amostragens de solo realizadas aos 15 e 30 dias após a adubação (Figura 4.4).

Os dados de emissão de N_2O também podem ser indicadores indiretos de inibição de nitrificação. As emissões foram significativamente menores no tratamento com DCD (Figura 4.5). Vários estudos indicam que inibidores de nitrificação resultam na diminuição das emissões de N_2O (SNYDER et al., 2009; SNYDER et al., 2014), inclusive em cana-de-açúcar (SOARES et al., 2015). No entanto, no presente estudo, alguma redução de N_2O foi observada com o tratamento contendo o extrato de *S. sponteneum*, mas, não com *B. humidicola* (Figura 4.6). Desse modo, as evidências observadas de que extratos de raízes dessas gramíneas levam à redução da nitrificação podem ser consideradas, no presente estudo, como fracas e não conclusivas.

Subbarao et al. (2009) indicaram que a produção compostos inibidores de nitrificação por raízes é estimulada quando as plantas crescem em meio contendo N amoniacal. O pasto de onde as plantas de *B. humidicola* foram obtidas não era adubado e não há registro do manejo da área de onde as raízes de *S. spontaneum* foram retiradas. Portanto, é possível que as condições de produção daquelas gramíneas não tenham sido as ideais para a formação de inibidores de nitrificação.

Outros trabalhos realizados no Brasil também indicam efeitos relativamente pequenos ou até pouco significativos de Brachiarias na redução da nitrificação. Moro et al. (2013) não encontraram efeito do cultivo anterior de Brachiarias, inclusive *B. humidicola*, sobre o acúmulo de NH_4^+ no solo em comparação com o uso de DCD. Fernandes et al. (2011) por outro lado, observaram que o teor de nitrato em solo adubado com sulfato de amônio, em estudo feito em vasos, foi menor quando *Brachiaria brizantha*, *B. ruziziensis* e *B. decumbens* haviam sido cultivadas anteriormente, comparados com o tratamento controle, sem plantas.

Devido ao solo no experimento ter sido obtido de uma área sob cultivo é possível que a microbiota responsável pela nitrificação estivesse suficientemente ativa, pois no momento da aplicação dos tratamentos a quantidade de $N\text{-}NO_3^-$ era de cerca de 9 mg $N\text{-}NO_3^-$ kg^{-1} solo e a disponibilidade de $N\text{-}NH_4^+$ muito baixa. Apesar dos valores de $N\text{-}NO_3^-$ aos 45 DAF no tratamento SA+DCD terem sido significativamente inferiores que SA, os valores $N\text{-}NO_3^-$ obtidos no tratamento SA+DCD possivelmente são oriundos do N já existente no solo. Aos 45 DAF houve um pico de $N\text{-}NO_3^-$ no solo no tratamento SA indicando que houve maior nitrificação no tratamento sem aplicação de inibidor.

Mesmo sem exercer efeito inibitório no processo de nitrificação, a adição de extratos radiculares de *B. humidicola* e *S. spontaneum* ao fertilizante nitrogenado favoreceu o crescimento das plantas de cana-de-açúcar em altura, diâmetro de colmo e biomassa de parte aérea e sistema radicular. Esse efeito pode estar relacionado a presença de cerca de 45 compostos nos extratos de BCH e SCH, sendo que para alguns destes metabólitos já foi comprovada sua ação em crescimento de raiz e parte aérea (Tabela 4.4). Este foi o caso do aminoácido não proteico, gamma-aminobutirato (GABA), cuja aplicação exógena pode influenciar a absorção de nitrato, provendo crescimento de raízes nas plantas conforme verificado em *Arabidopis thaliana* por Barbosa et al. (2000). Outro exemplo de efeito positivo no crescimento de plantas foi relatado por Stoyanova e Doncheva (2002). Esses autores comprovaram que a presença de succinato promove maior crescimento radicular por meio do aumento da absorção de fósforo. Por ter sido extraída de extratos radiculares, é provável que na solução de BCH e SCH houvesse quantidade significativa de fitohormônios tais como auxina (AIA). Embora seja sintetizado no meristema apical caulinar, é translocado em direção ao sistema radicular, onde promove o crescimento desse tecido (OVERVOORDE et al., 2010).

A adição de DCD junto ao sulfato de amônio proporcionou uma passagem mais gradual do NH_4^+ a NO_3^-, reduzindo a nitrificação. Em função disso, foi constatada uma redução nos fluxos diários de N_2O (Figura 4.5) proporcionando uma diminuição na emissão acumulada de N_2O equivalente a 57% no final do ensaio. Apesar de ainda existirem informações

controversas sobre o uso desses aditivos para diferentes sistemas agrícolas, o efeito DCD na inibição da nitrificação tem se apresentado como estratégia eficaz na redução das emissões de N_2O associadas ao uso de fertilizantes nitrogenados em cana-de-açúcar no Brasil, local onde que pelo clima tropical poderia ser esperado menor eficiência dessas moléculas. Vargas et al. (2014) demonstraram que o efeito sinérgico da manutenção da palhada de cana-de-açúcar e da adubação nitrogenada na emissão de N_2O foi diminuída pela uso de DCD junto ao fertilizante nitrogenado em até 70% dependendo da quantidade de palhada sobre o solo. Em um ensaio de campo conduzido por dois anos, Soares et al. (2015) encontraram que a redução da emissão de N_2O em função da aplicação de DCD junto a ureia na cana-de-açúcar pode ser reduzida entre 81-95%. Tais autores também constataram que a reaplicação de DCD não ocasionara perda de eficiência do DCD no efeito mitigatório sobre a emissão de N_2O. Dessa forma, este estudo corrobora à essas informações prévias que o uso desse inibidor de nitrificação é uma ferramenta capaz de reduzir o impacto ambiental provocado pela adubação nitrogenada da cana-de-açúcar. Inibidores de nitrificação podem promover a redução da emissão de N_2O tanto por tornarem a nitrificação mais gradual, que é uma fonte importante em solos agrícolas (WEISKE et al., 2001; CHEN et al., 2010) quanto por diminuírem a quantidade de NO_3^- disponível a desnitrificação que ocorre em condições de baixa pressão de O_2. Neste ensaio as perdas de N_2O de ambos os processos podem ter ocorrido simultaneamente, entretanto é provável que perdas oriundas da nitrificação tenham sido predominantes, haja visto que não houve limitação de O_2 durante o ensaio e o solo por ser constituído quase que totalmente de areia não apresentava sítios com baixa pressão de O_2 em função da macroporosidade do mesmo.

Os extratos radiculares de *Brachiaria* não reduziram a emissão de N_2O quando associados ao sulfato de amônio em comparação ao uso isolado do fertilizante. É possível que a forma como que o extrato radicular foi obtida tenha influenciado a capacidade de inibir a nitrificação e a emissão de N_2O. Ao realizar uma leve maceração no sistema radicular, ocorre liberação de C solúvel aplicado ao solo junto com o extrato. O aumento da disponibilidade de C solúvel pode ter estimulado a desnitrificação por ser fonte de energia para os microorganismos (FIRESTONE; DAVIDSON, 1989), mesmo que os extratos tenham atuado inibindo a nitrificação e tenham reduzido à disponibilidade de NO_3^- no solo. Em condições naturais de pastagens de Brachiaria, a braquialactana é liberada isoladamente no solo em função da disponibilidade de NH_4^+ e provavelmente não há aumento da concentração

de C solúvel em função da liberação da mesma. Embora sejam necessários mais estudos, Subarao et al. (2007) verificaram que em pastagens estabelecidas de Brachiaria a população de nitrificadores é suprimida influenciando diretamente a nitrificação e a produção de N_2O.

4.5 Conclusões

A aplicação de extratos de raízes de *Brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* junto ao sulfato de amônio aumentou o crescimento inicial da cana-de-açúcar, no entanto o efeito sobre a nitrificação e a emissão de N_2O do solo foi pouco significativo. O uso de DCD junto ao N-fertilizante inibiu a nitrificação do N aplicado e consequentemente a emissão de N_2O do solo, sem contudo aumentar o crescimento inicial da cana-de-açúcar. As plantas de cana-de-açúcar não se beneficiaram da maior presença de N amoniacal promovida pela DCD. A adição de extratos de gramíneas promoveu aumento na produção de matéria seca de cana-de-açúcar, provavelmente devido a efeito estimulante de crescimento de compostos presentes nos extratos.

Referências

BARBOSA, J. M.; LOCY, R. D.; BARGER, T. W.; SINGH, N. K.; CHERRY, J. H. GABA increases the rate of nitrate uptake and utilization in *arabidopsis* roots. In: CHERRY, J. H.; LOCY, R. D.; RYCHTER, A. (Ed.). **Plant tolerance to abiotic stresses in agriculture**: role of genetic engineering. Heidelberg: Springer, 2000. P. 53-63.

BOUDSOCQ, S.; LATA, J. C.; MATHIEU, J.; ABBADIE, L.; BAROT. S. Modelling approach to analyses the effects of nitrification inhibition on primary production. **Functional Ecology,** London, v. 23, p. 220–230, 2009.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCS, 2007. p. 375-470.

CARDOSO, T. F.; CAVALETT, O.; CHAGAS, M. F.; MORAIS, E. R.; CARVALHO, J. L. N.; FRANCO, H. C. J.; GALDOS, M. V.; SCARPARE, F. V.; BRAUNBECK, O. A.; CORTEZ, L. A. B.; BONOMI, A. Technical and economic assessment of straw recovery in the sugarcane bioenergy production system. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 70, p. 353-360, 2013.

CARMO, J. B.; NEILL, C.; GARCIA-MONTIEL, D. C.; PICCOLO, M. C.; CERRI, C. C.; STEUDLER, P. A.; ANDRADE, C. A.; PASSIANOTO, C. C.; FEIGL, B. J.; MELILLO, J. M. Nitrogen dynamics during till and no-till pasture restoration sequences in Rondônia, Brazil. **Nutrient Cycling in Agroecosystems,** Heidelberg, v. 71, p. 213-225, 2005.

CERRI, C. C.; GALDOS, M. V.; MAIA, S. M. F.; BERNOUX, M.; FEIGL, B. J.; POWLSON, D.; CERRI, C. E. P. Effect of sugarcane harvesting systems on soil carbon stocks in Brazil: an examination of existing data. **European Journal Soil Science,** Oxford, v. 62, p. 23-28, 2011.

CHEN, D.; SUTER, H. C.; ISLAM, A.; EDIS, R. Influence of nitrification inhibitors on nitrification and nitrous oxide emission from a clay loam soil fertilized with urea. **Soil Biology and Biochemistry,** Oxford, v. 42, p. 660-664, 2010.

CHIEN, S. H.; PROCHNOW, L. I.; CANTARELLA, H. Recent developments of fertilizer production and use to improve nutrient efficiency and minimize environmental impacts. **Advances in Agronomy,** San Diego, v. 102, p. 267-322, 2009.

CUADROS-INOSTROZA, A.; CALDANA, C.; REDESTIG, H.; KUSANO, M.; LISEC, J.; PENA-CORTES, H.; WILLMITZER, L.; HANNAH, M. A. TargetSearch - a Bioconductor package for the efficient preprocessing of GC-MS metabolite profiling data. **BMC Bioinformatics,** London, v. 10, p. 428. doi: 10.1186/1471-2105-10-428.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M. P.; JESUS, C. D. F.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, Amsterdam, v. 109, p. 72-78, 2013.

FAO. **FAOSTAT**. Rome, 2015. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> Acesso em: 15 nov. 2015.

FERNANDES, A. M.; DE ANDRADE, G. J. M.; DE SOUZA, E. F. C.; ROSOLEM, C. A.; Brachiaria species affecting soil nitrification. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo,** Viçosa, v. 35, p. 1699-1706, 2011.

FIRESTONE, M. K.; DAVIDSON, E. A. Microbiological basis on NO and N_2O production and consumption in soil. In: ANDREAE, M. O.; SCHIMEL. D. S. (Ed.). **Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and atmosphere**. New York: Wiley, 1989. p. 7-21.

FORTES, C.; TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C. Long Term decomposition of sugarcane harvest residues in Sao Paulo State Brazil. **Biomass & Bioenergy,** Oxford, v. 42, p. 189-198, 2012.

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,** Santa Maria, 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 Crop Research,** Amsterdam, v. 121, p. 29-41, 2011.

FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; FARONI, C. E.; VITTI, A. C.; OTTO, R. Stalk yield and technological attributes of planted cane as related to nitrogen fertilization. **Scientia Agrícola,** Piracicaba, v. 67, p. 579-590, 2010.

GIAVALISCO, P.; LI, Y.; MATTHES, A.; ECKHARDT, A.; HUBBERTEN, H. M.; HESSE, H.; SEGU, S.; HUMMEL, J.; KÖHL, K.; WILLMITZER. L. Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using (13)C, (15)N and (34)S isotope labelling, in combination with high- resolution mass spectrometry. **The Plant Journal,** Oxford, v. 68, p. 364-376, 2011.

GINÉ, M. F.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E. A. G.; REIS, B. F. Simultaneous determination of nitate and nitrite by flows injection analysis. **Analytical Chimica Acta,** Amsterdam, v. 114, p. 191-197, 1980.

GOPALAKRISHNAN, S. G.; WATANABE, T.; PEARSE, S. J.; ITO, O.; HOSSAIN, Z. A. K. M.; SUBBARAO, G. V. Biological nitrification on inhibition by Brachiaria humidicola roots varies with soil type and inhibits nitrifying bacteria, but not other major soil microorganisms. **Soil Science and Plant Nutrition,** Tokyo, v. 55, p. 725-733, 2009.

JANTALIA, C. P.; SANTOS, H. P.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R. Fluxes of nitrous oxide from soil under different crop rotations and systems in the south of Brazil. **Nutrient Cycling and Agroecosystems,** The Hague, v. 82, p. 161-173, 2008.

LATA, J. C.; DEGRANGE, V.; RAYNAUD, X.; MARON, P. A.; LENSI, R.; ABBADIE, L. Grass population control nitrification in Savanna soils. **Functional Ecology,** London, v. 13, p. 762–763, 2004.

LATA, J. C.; DURAND, J.; LENSI, R.; ABBADIE. L. Stable coexistence of contrasted nitrification statuses in a wet tropical savanna ecosystem. **Functional Ecology,** London, v. 13, p. 762–768, 1999.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols,** London, v. 1, p. 387-396, 2006.

LIVINGSTON, G. P.; HUTCHINSON, G. L. Enclosure-based measurement of trace gas exchange: applications and sources of error. In: MATSON, P. A.; HARRIS, R. C. (Ed.). **Biogenic trace gases: measuring emissions from soil and water**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1995. p. 14-51.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MORO, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; CANTARELLA, H. Teor de nitrogênio inorgânico no solo em função de plantas de cobertura, fontes de nitrogênio e inibidor de nitrificação. **Pesquisa Agropecuaria Tropical,** Goiania, v. 43, p. 424-435, 2013.

NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Determination of total nitrogen in plant material. **Agronomy Journal,** Madison, v. 65, p. 109-112, 1973.

OLIVEIRA, M. W.; TRIVELIN, P. C. O.; GAVA, G. J. C.; VITTI, A. C. Lixiviação de nitrogênio em solo cultivado com cana-de-açúcar: experimento em lisímetro. **STAB. Açúcar, Álcool e Sub-Produtos,** Piracicaba, v. 8, p. 28-31, 1999.

OVERVOORDE, P.; FUKAKI, H.; BEECKMAN T. Auxin control of root development. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology,** Long Island, v. 2, n. 6, a001537, 2002. doi: 10.1101/cshperspect.a001537.

PRASERTSAK, P.; FRENEY, J. R.; DENMEAD, O. T.; SAFFIGNA, P. G.; PROVE, B. G.; REGHENZANI, J. R. Effects of fertilizer placement on nitrogen loss from sugarcane in tropical Queensland. **Nutrient Cycling in Agroecosystems,** Heidelberg, v. 62, p. 229-239, 2002.

RAIJ, B. van.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo.** 2. ed. Campinas: Instituto Agronômico, Fundação IAC, 2001. 285 p.

REIS, B. F.; VIEIRA, J. A.; KRUG, F. J.; GINÉ, M. F. Development of a flow injections system two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society,** São Paulo, v. 8, p. 523-528, 1997.

RENTSCHER, D.; SCHMIDT, S.; TEGEDER, M. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. **Amino Acids,** Wien, v. 581, p. 2281-2289, 2007.

ROBINSON, N.; BRACKIN, R; SOPER, K. V. F.; GAMAGE, J. H. H.; PAUNGFOO-LONHIENNE, C.; RENNENBERG, H.; LAKSHMANAN, P.; SCHMIDT, S. Nitrate paradigm does not hold up for sugarcane. **PloS One,** San Franscisco, v. 6, n. 4, p. 1-9, 2011.

SNYDER, C. S.; BRUULSEMA, T. W.; JENSEN, T. L.; FIXEN, P. E. Review of greenhouse gas emissions from crop production systems and fertilizer management effects. **Agriculture Ecosystems & Environment,** Amsterdam, v. 133, p. 247-266, 2009.

SNYDER, C. S.; DAVIDSON, E. A.; SMITH, P.; VENTEREA, R. T. Agriculture: sustainable crop and animal production to help mitigate nitrous oxide emissions. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, Maryland Heights, v. 9, n. 10, p. 46-54, 2014.

SOARES, J. R.; CANTARELLA, H.; VARGAS, V. P.; CARMO, J. B.; MARTINS, A. A.; SOUSA, R. M.; ANDRADE, C. A. Enhanced-efficiency fertilizers in nitrous oxide emissions from urea applied to sugarcane. **Journal of Environmental Quality**, Madisn, v. 44, p. 423-430, 2015.

STOYANOVA, Z.; DONCHEVA, S. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. **Brazilian Journal of plant physiology,** Londrina, v. 14, p. 111-116, 2002.

SUBBARAO, G. V.; NAKAHARA, K.; HURTADO, M. P.; ONO, H.; MORETA, D. E.; SALCEDO, A. F.; YOSHIHASHI, A. T.; ISHIWAWA, T.; ISHITANI, M.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; YOSHIDA, M.; RONDON, M.; RAO, I. M.; LASCANO, C. E.; BERRY, W. L.; ITO, O. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washignton, DC, v. 106, p. 17301-17307, 2009.

SUBBARAO, G. V.; RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; LASCANO, C.; BERRY, W. L. Biological nitrification inhibition (BNI) - is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 294, p. 5-18, 2007a.

SUBBARAO, G. V.; WANG, H. Y.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; BERRY, W. L. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in Brachiaria humidicola roots. **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 290, p. 245–257, 2007b.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas de nitrogênio da ureia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 37, p. 193-201, 2002b.

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 e com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 26, p. 637-646, 2002a.

TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J. Adubação nitrogenada e a sustentabilidade de agrossistemas. **Tópicos em Ciência do Solo,** Viçosa, v. 7, p. 193-219, 2011.

VARGAS, V. P.; CANTARELLA, H.; MARTINS, A. A.; SOARES, J. R.; CARMO, J. B. Sugarcane crop residue increases N_2O and CO_2 emissions under high soil moisture conditions. **Sugar Tech,** New Delhi, v. 16, p. 174-179, 2014.

VITTI, A. C.; FRANCO, H. C. J.; TRIVELIN, P. C. O.; TRIVELIN, P. C. O.; FERREIRA, D. A.; OTTO, R.; FORTES, C.; FARONI, C. E. Nitrogênio proveniente da adubação nitrogenada e de resíduos culturais na nutrição da cana-planta. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, DF, v. 46, p. 287-293, 2011.

WACLAWOVSKY, A. J.; SATO, P. M.; LEMBKE, C. G.; MOORE, P. H.; SOUZA, G. M. Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnology Journal,** Oxford, v. 8, p. 263-276, 2010.

WECKWERTH, W.; WENZEL, K.; FIEHN, O.; Process for the integrated extraction identification, and quantification of metabolites, proteins and RNA to reveal their co-regulation in biochemical networks. **Proteomics,** Weinheim, v. 4, p. 78-83, 2004.

WEISKE, A.; BENCKISER, G.; OTTOW, J. C. G. Effect of the new nitrification inhibitor DMPP in comparison to DCD on nitrous oxide (N2O) emissions and methane (CH4) oxidation during 3 years of repeated applications in field experiments. **Nutrient Cycling in Agroecosystems,** Heidelberg, v. 60, p. 57-64, 2001.

ZAMAN, M.; SAGGAR, S.; BLENNERHASSETT, J. D.; SINGH, J. Effect of urease and nitrification inhibitors on N transformation, gaseous emissions of ammonia and nitrous oxide, pasture yield and N uptake in grazed pasture system. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 1270-1280, 2009.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A motivação para realização desse trabalho se deu pelo fato de que existe pouca informação, ainda, sobre a eficiência de utilização dos nutrientes para a cana-de-açúcar. Sabe-se que o melhoramento genético da cultura é bastante difícil e que tem como premissas principais o incremento de produtividade de biomassa e de sacarose, além de características como resistência ao pisoteio de máquinas e a incidência de doenças. Os genótipos são alocados principalmente com base em época de colheita, e também com informações do tipo de solo (variedades de solos bons e ruins), basicamente por não haver informações suficientes disponíveis na literatura. Com isso, genótipos podem estar sendo cultivados muitas vezes erroneamente, não permitindo a exploração do seu máximo potencial produtivo. A escolha do programa de melhoramento RIDESA ocorreu devido a grande representatividade dos seus genótipos nas áreas canavieiras do Brasil que, segundo censo varietal 2014, representa cerca de 54% do total de área cultivada.

Embora o solo seja o grande reservatório natural responsável por disponibilizar N para as plantas pela mineralização da matéria orgânica do solo (MOS), a eficiência de utilização de N em cana-de-açúcar é muito baixa, quase sempre menor que 40%. Nesse trabalho estão contidos os resultados de uma primeira fase, realizada com genótipos de cana-de-açúcar em condições controladas, sendo que a sequência dos estudos consiste na realização de um experimento em campo com o máximo de genótipos possível, visando a confirmação dos resultados obtidos em casa de vegetação. No entanto, com resultados obtidos foi possível identificar que na fase inicial de crescimento a eficiência de utilização de N (EUN) está diretamente relacionada com a quantidade de raízes de cada genótipo, por outro lado, a capacidade fotossintética está menos associada com uma elevada EUN. Essa informação pode contribuir para seleção de novos genótipos que visam um aumento na EUN.

Os resultados desse trabalho com quatro genótipos de cana-de-açúcar, contrastantes em EUN, também evidenciou que a cultura apresenta preferência de absorção por amônio nas primeiras horas após a aplicação do N-fertilizante. O grande benefício dessa informação está relacionado com a possibilidade de se adubar a cana-de-açúcar com fontes amoniacais e obter melhores aproveitamentos do N-fertilizante. Sabendo que após um curto período todo o amônio no solo pode transformar-se em nitrato, a absorção inicial da cultura pode representar uma melhora no aproveitamento do N proveniente do fertilizante. Aditivamente, pode se pensar em utilizar inibidores de nitrificação para propiciar maior tempo de residência do amônio no solo, e assim contribuir para aumentar a eficiência de uso de N pela cana-de-açúcar.

Subbarao e colaboradores (SUBBARAO et al. 2007a, 2007b) a algum tempo tem indicado que há uma produção de compostos inibidores de nitrificação por raízes de plantas, principalmente do gênero Brachiaria. Assim, considerando que as áreas de expansão da cana-de-açúcar estão localizadas em regiões onde é muito comum a ocorrência de plantas desse gênero, seria possível a cana-de-açúcar obter vantagens principalmente no aproveitamento do N no solo, e até mesmo apresentar essa característica em seus ancestrais como *Saccharum spontaneum.* Porém como em outros trabalhos realizados no Brasil (FERNANDES et al. 2011; MORO et al. 2013) verificou-se efeitos pouco significativos de extratos de *brachiaria humidicola* e *Saccharum spontaneum* na redução da nitrificação. Comparativamente o uso de DCD inibidor de nitrificação comercial mostrou-se eficiente para esse fim, impactando inclusive na redução da emissão de N_2O conforme verificado em outros trabalhos (SNYDER et al., 2014; SOARES et al., 2015). Embora a aplicação de DCD ainda seja pouco viável em grandes áreas, principalmente devido ao alto custo, seu uso como mitigador das emissões de N_2O provenientes de fertilizantes nitrogenados tem grande potencial.

Referencias

FERNANDES, A. M.; DE ANDRADE, G. J. M.; DE SOUZA, E. F. C.; ROSOLEM, C. A.; Brachiaria species affecting soil nitrification. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo,** Viçosa, v. 35, p. 1699-1706, 2011.

MORO, E.; CRUSCIOL, C. A. C.; NASCENTE, A. S.; CANTARELLA, H. Teor de nitrogênio inorgânico no solo em função de plantas de cobertura, fontes de nitrogênio e inibidor de nitrificação. **Pesquisa Agropecuaria Tropical,** Goiania, v. 43, p. 424-435, 2013.

SNYDER, C. S.; DAVIDSON, E. A.; SMITH, P.; VENTEREA, R. T. Agriculture: sustainable crop and animal production to help mitigate nitrous oxide emissions. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, Maryland Heights, v. 9, n. 10, p. 46-54, 2014.

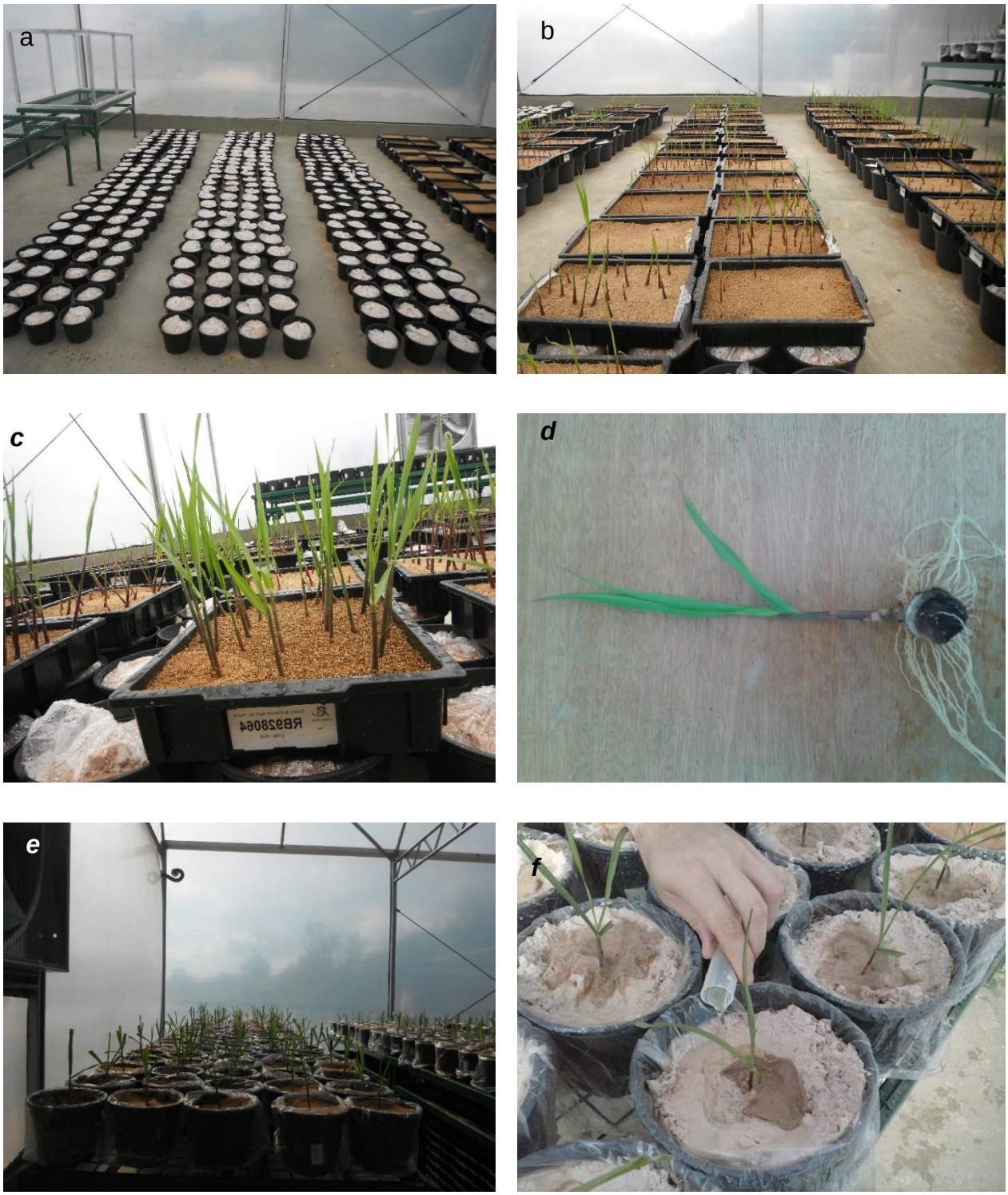
SOARES, J. R.; CANTARELLA, H.; VARGAS, V. P.; CARMO, J. B.; MARTINS, A. A.; SOUSA, R. M.; ANDRADE, C. A. Enhanced-efficiency fertilizers in nitrous oxide emissions from urea applied to sugarcane. **Journal of Environmental Quality**, Madisn, v. 44, p. 423-430, 2015.

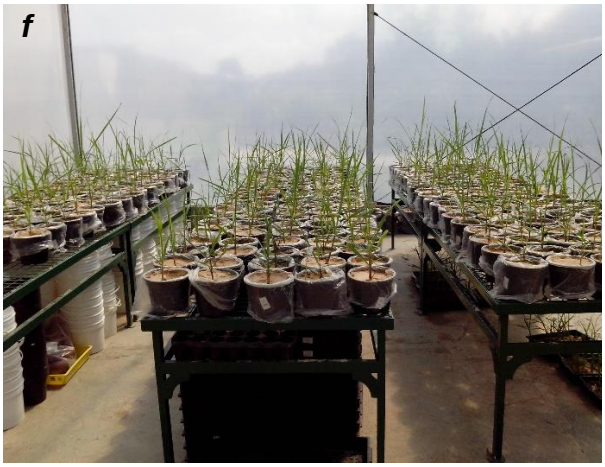
SUBBARAO, G. V.; RONDON, M.; ITO, O.; ISHIKAWA, T.; RAO, I. M.; NAKAHARA, K.; LASCANO, C.; BERRY, W. L. Biological nitrification inhibition (BNI) - is it a widespread phenomenon? **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 294, p. 5-18, 2007a.

SUBBARAO, G. V.; WANG, H. Y.; ITO, O.; NAKAHARA, K.; BERRY, W. L. NH_4^+ triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in Brachiaria humidicola roots. **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 290, p. 245–257, 2007b.

APENDICES

Apêndice A – Fotos do experimento eficiência de utilização de N em genótipos ***a:*** Incubação do solo nos vasos antes do transplante das mudas; ***b:*** Detalhe da germinação dos genótipos 14 dias após o plantio (DAP); ***c:*** Mudas dos genótipos com 21 DAP; ***d:*** Detalhe do sistema radicular nas mudas; ***e:*** Visual das plantas após o transplantio; ***f:*** Aplicação dos nutrientes P, K e micronutrientes; ***f:*** Visual das plantas antes da aplicação dos tratamentos de N; ***g*** e ***h***: Diferenças entre doses de N no momento da avaliação final;




f

g

h
Low N
Medium N
High N

Apêndice B – Fotos experimento de preferência de absorção de amônio de genótipos contrastantes em EUN ***a:*** Detalhe controlador de umidade e temperatura da câmara de crescimento; ***b:*** Visual das plantas logo após a colocação na câmara; ***c:*** Aplicação dos nutrientes K, P e micronutrientes; ***d:*** Aplicação do N marcado e DCD nos vasos dos tempo T24 e T72; ***e:*** Aspecto das plantas no momento da aplicação do N marcado depois de 69 dias dentro da câmara; ***f:*** Detalhe da separação das raízes do solo no final do experimento.

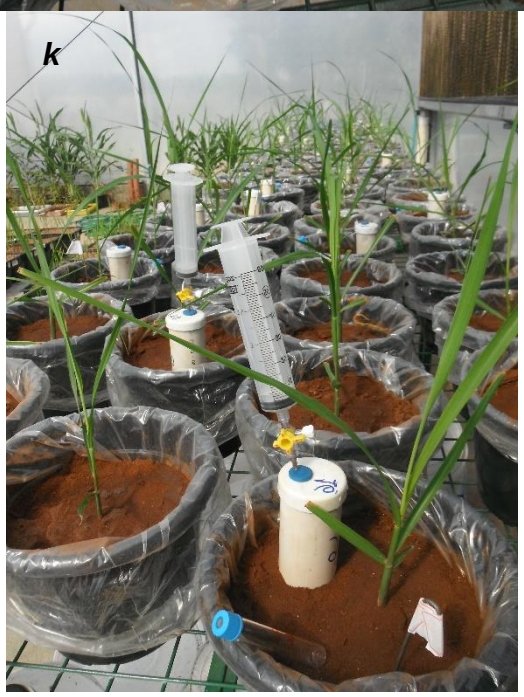
Apêndice C – Fotos do experimento extratos radiculares de Brachiaria humidicola e Saccharum spontaneum a: Transplantio das mudas para os vasos; b: Visual das plantas no dia da aplicação dos tratamentos de N e extratos; c e d: Raízes frescas de Brachiaria humidicola e Saccharum spontaneum; e: Extratos de B. humidicola e S. spontaneum; f: Aplicação dos extratos dentro das câmaras de coleta de gás; g: Sulco realizado para a aplicação do DCD e na sequencia o N-fertilizante; h: aplicação de extratos radiculares 200 ml por vaso; i: Detalhe câmara de coleta e Exetainer utilizado para armazenar o gás; j: Detalhe das plantas na última fase do experimento; k: Detalhe da primeira coleta de gases com as plantas jovens; L: Aspecto das plantas nas coletas finais de gases;

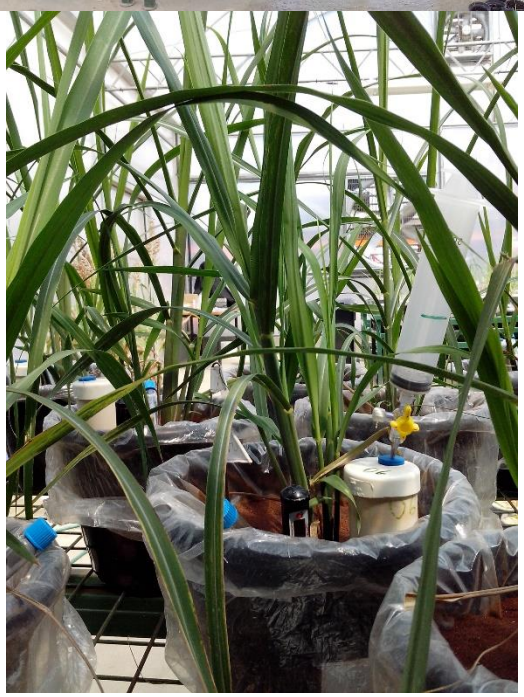
g

h

i
10
10

j


k


L