

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

DISSERTAÇÃO

**Avaliação Através de RT-PCR da Expressão dos
Genes que Codificam para Enzimas de Assimilação
de Nitrogênio em Variedades de Arroz**

Carlos Alberto Bucher

2007



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

**AVALIAÇÃO ATRAVÉS DE RT-PCR DA EXPRESSÃO DOS GENES
QUE CODIFICAM PARA ENZIMAS DE ASSIMILAÇÃO DE
NITROGÊNIO EM VARIEDADES DE ARROZ**

CARLOS ALBERTO BUCHER

Sob a Orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2007

633.18
B919a
T

Bucher, Carlos Alberto, 1981-

Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio de arroz / Carlos Alberto Bucher. – 2007. 50 f. : il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 33-37.

1. Arroz – Cultivo – Teses. 2. Plantas – Efeito do nitrogênio – Teses. I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta dissertação, desde que seja citada a fonte.

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

CARLOS ALBERTO BUCHER

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01/03/2007

Manlio Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Carolina do Nascimento Spiegel. Dra. UFF

Lilia Bender Machado. Dra. UFRRJ

DEDICATÓRIA

A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todas as decisões que tomei para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus queridos e amados pais, que sempre me deram forças e torceram por mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a força e sabedoria para enfrentar a caminhada e chegar até aqui.

Aos meus pais, meu irmão, minha família, mesmo distante, sempre os tive em meu coração, me criaram com muito amor e carinho, sempre me incentivaram aconselharam, deram forças, mostraram o certo e o errado, me mostraram o caminho para me tornar a pessoa que sou hoje e sempre.

À Natalia, minha linda, que me acompanhou durante esse período, me deu carinho, amor, conselhos e compreensão sempre que precisei.

Ao Prof. Manlio Silvestre Fernandes pela confiança, oportunidade, orientação e ensinamentos sobre pesquisa científica.

A Prof^ª. Sonia Regina de Souza pela orientação, ensinamentos, conselhos e carinho na condução dos trabalhos.

A Elvia Mariam Lis Martinez Stark pelo incentivo e conselhos na condução dos trabalhos.

Ao Dr. Eduardo Matos Nogueira da UFRJ pelo auxílio nas análises de RT-PCR.

Aos colegas pelo apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais.

Ao CPGA-CS e sua coordenação pela atenção e carinho com que fui tratado.

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento.

A todos que de alguma forma contribuíram para elaboração deste trabalho.

BIOGRAFIA

Carlos Alberto Bucher nasceu na cidade de Itaguaçu – ES, em 11 de maio de 1981. Concluiu o ensino fundamental na Escola Eurico Salles, formou em Técnico em Agropecuária Técnico na Escola Agrotécnica de Colatina –ES 1998. Iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1999, diplomando-se em 2005. Durante a graduação foi bolsista de Pré-iniciação Científica e bolsista de Iniciação Científica por 5 anos no Laboratório de Nutrição mineral de Plantas do Departamento de Solos estudando absorção de nitrogênio sob orientação do Prof Manlio Silvestre Fernandes. Em março de 2005 iniciou o mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo sob a orientação da Prof Manlio Silvestre Fernandes.

RESUMO

BUCHER, Carlos Alberto. **Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz.** Seropédica, RJ. 2007. 37f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Para verificar os mecanismos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pela eficiência de uso de nitrogênio em arroz, duas variedades de arroz, Piauí (tradicional do estado do Maranhão) e IAC 47 (melhorada), foram cultivadas em câmaras de crescimento, em sistema hidropônico, e submetidas a diferentes níveis de $N-NO_3^-$. Como estratégia de trabalho cultivou-se as plantas por 18 dias, contados após a germinação, em meio básico, submeteu-as por 72 horas sem suplementação de N e depois foram divididas em 3 grupos e aplicado os tratamentos. O primeiro recebeu 0,15 mM de $N-NO_3^-$, o segundo submetido a 5 mM de $N-NO_3^-$ e o terceiro sem adição de N. Depois de aplicados os tratamentos foram realizadas as coletas nos tempos 0, 1, 3, 6, 9, 24, 48 horas e amostras de parte aérea e raiz foram coletadas para análise de nitrato, N-amino, amônio, açúcares solúveis e a expressão dos genes que codificam para a enzima nitrato redutase (NADH-NR) e isoformas da enzima glutamina sintetase (GS) (GS1.1, GS1.2, GS2, GS2c, GSI) nos tempos 0, 6, e 24 horas. A variedade Piauí, depois de cultivada por 72 horas sem N, manteve baixos teores de NO_3^- . Estas também apresentaram maior expressão de OsGS1.1. Isto sugere a participação desta enzima no controle do fluxo interno de N, quando sob deficiência deste nutriente na solução externa. Sob alto nível de N, a variedade Piauí acumulou maiores teores de N-amino nas folhas, menor expressão e atividade da nitrato redutase. Também nestas plantas, não houve diferenças na atividade da glutamina sintetase, entretanto, ocorreu aumento da expressão de OsGS2 (GS2), sugerindo ser este o principal gene que codifica a GS responsável pela atividade de GS em plantas de arroz sob nutrição nítrica.

Palavras - chave: Nitrato. Variedades tradicionais. Nitrato redutase. Glutamina sintetase.

ABSTRACT

BUCHER, Carlos Alberto. **Evaluation by RT-PCR of the expression of genes that codify for enzymes of nitrogen assimilation in rice varieties.** Seropédica-RJ, 2007. 37p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2000.

To verify the biochemical and physiological mechanisms involved in the nitrogen efficiency usage in rice, two rice varieties, Piauí (traditional from Maranhão State) and IAC 47 (breed), were cultivated in growth chambers, in hydroponics system, and submitted to different levels of N-NO_3^- . As a study strategy the plants were cultivated for eighteen days, counted after germination, in a basic media, submitted for 72 hours without nitrogen, and then they were divided in three groups and applied the treatments. The first received 0.15 mM, a second group received 5 mM of N-NO_3^- while a third group stayed without nitrogen. After treatment application, plants were harvested at 0, 1, 3, 6, 9, 24 and 48 hours, and samples of shoots and root were taken for determination of nitrate, ammonium-N, amino-N soluble sugars and gene expression of the enzymes nitrate reductase (NADH-NR) and glutamine synthetase isoforms (GS) (GS1.1, GS1.2, GS2, GS2c, GSI) at 0, 6 and 24 hours. The Piauí variety, after 72 hours without N, still kept small NO_3^- levels. Also, the variety Piauí presented a higher expression of OsGS1.1 gene, which suggests the participation of this enzyme in the control of internal N fluxes, when in absence of nitrogen in the external solution. Under high N level, the Piauí variety accumulated larger amounts of amino-N in the leaves, had small nitrate reductase expression and activity. In spite of no differences in glutamine synthetase activity, an increase in OsGS2 (GS2) expression was observed, suggesting that this is the main GS isoform responsible for the GS activity in rice plants under nitrate nutrition.

Key words: Nitrate. Landrace. Nitrate reductase. Glutamine synthetase.

LISTA DE SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Trifosfato (<u>A</u> denosine <u>T</u> riphosphate)
BSA	Albumina de Soro Bovino (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)
DAG	<u>D</u> ias <u>A</u> pós a <u>G</u> erminação
DTT	<u>D</u> itiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
Fd	<u>F</u> erredoxina
GS	<u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (<u>H</u> igh <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (<u>L</u> ow <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Reduzida
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NIR	<u>N</u> itrito <u>R</u> edutase
NR	<u>N</u> itrato <u>R</u> edutase
NRT1	Família de Genes para os Transportadores de NO ₃ ⁻ de Baixa Afinidade
NRT2	Família de Genes para os Transportadores de NO ₃ ⁻ de Alta Afinidade
OsGS1.1	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>1.1</u>
OsGS1.2	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>1.2</u>
OsGS2	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>2</u>
OsGS2c	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>2c</u>
OsGSI	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>I</u>
OsNR2	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>N</u> itrato <u>R</u> edutase <u>2</u>
PVP	Polivinilpirrolidona
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro (<u>R</u> ibonucleic <u>á</u> cid <u>m</u> enseger)
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Primers específicos usados nas análises de RT-PCR quantitativo em tempo... 12

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do experimento realizado para avaliação da dinâmica de absorção de NO_3^- entre variedades tradicionais e melhoradas de arroz.	9
Figura 2. Teores de nitrato em Folhas Bainhas e Raízes de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,015mM e 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio).....	15
Figura 3. Teores de N-amino em Folhas Bainhas e Raízes de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM e 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio).....	17
Figura 4. Teores de açúcares solúveis em Folhas Bainhas e Raízes de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas 0,15mM e 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio).....	19
Figura 5. Atividade da Nitrato Redutase em raízes, folhas e bainhas de plantas de arroz, variedade IAC-47 e Piauí, submetidas a 0,15 mM de NO_3^- , e controle (sem N).	20
Figura 6. Atividade da Nitrato Redutase em raízes, folhas e bainhas de plantas de arroz, variedade IAC-47 e Piauí, submetidas a 5,0 mM NO_3^- e controle (sem N).	22
Figura 7. Atividade de Glutamina Sintetase em Folhas Bainhas e Raízes de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio).....	23
Figura 8. Atividade de Glutamina Sintetase em Folhas, Raízes e Bainhas de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio).....	24
Figura 9. Expressão relativa de genes que codificam para as enzimas Glutamina Sintetase: OsGS1.1 (A), OsGS1.2 (B), OsGS2 (C), OsGS2c (D) e OsGSI (E) e Nitrato Redutase: OsNR2 (F) em raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC 47, sob diferentes níveis de nitrato (sem nitrogênio, 0,15 mM e 5 mM de NO_3^-). A expressão do RNAm de actina foi usado para normalizar as amostras.	26
Figura 10. Atividade da Glutamina Sintetase (A e B) e da Nitrato Redutase (C e D) em folhas e raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, nos tempos: 0, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e com 0,15 mM e 5 mM de NO_3^-	27
Figura 11. Teores de N- NO_3^- (A e B), N-amino (C e D), N- NH_4^+ (E e F) e açúcares solúveis (G e H) em folhas e raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, nos tempos: 0, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e com 0,15 mM e 5 mM de NO_3^-	29
Figura 12. Expressão relativa de genes que codificam para as enzimas Glutamina Sintetase: OsGS1.1 (A), OsGS1.2 (B), OsGS2 (C), OsGS2c (D) e OsGSI (E) e Nitrato Redutase: OsNR2 (F) em folhas de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC 47, sob diferentes níveis de nitrato (sem nitrogênio, 0,15 mM e 5 mM de NO_3^-). A expressão do RNAm de actina foi usado para normalizar as amostras.	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Nitrato Redutase (NR, EC 1.6.6.1)	4
2.2 Glutamina Sintetase (GS, EC 6.3.1.2)	5
2.3 Análise de Expressão Gênica Através de RT-PCR Quantitativa em Tempo Real.	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Condução do Experimento em Câmara de Crescimento	9
3.2 Atividade da Nitrato Redutase	9
3.3 Atividade da Glutamina Sintetase	10
3.4 Frações Solúveis	10
3.5 Extração de RNA Total e RT-PCR.....	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1 Efeito de Nitrato em Solução Nutritiva sobre o Metabolismo de Plantas de Arroz.....	13
4.2 Expressão dos Genes que Codificam para a Glutamina Sintetase e Nitrato Redutase ...	25
5. CONCLUSÕES	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos solos das regiões tropicais possui baixa fertilidade natural e essa característica associada ao uso incorreto destes, resulta em diminuição da produtividade agrícola. Nessa situação, produtores rurais cada vez mais aumentam as aplicações de fertilizantes minerais, aumentando os custos de produção, podendo ainda ocasionar a contaminação dos lençóis freáticos com nitrato (NO_3^-) (Hirel, 2001).

O nitrogênio é um dos principais nutrientes responsáveis pelos altos custos dos insumos e tem tido muita atenção nas pesquisas buscando aumento de produção agrícola. No Brasil grandes avanços foram obtidos na produção de soja com as pesquisas sobre a fixação biológica de nitrogênio, no entanto em gramíneas estes estudos estão em fase inicial. Além disso, a redução do uso de fertilizantes nitrogenados pode ser alcançada não só através de técnicas eficientes de cultivo, mas também pelo uso de variedades que tenham uma maior eficiência no uso de nitrogênio.

Entre os cereais, consumidos pelo homem, principalmente pela população de baixa renda, o arroz destaca-se entre os mais importantes, sendo necessário, além da busca de altas produções, o desenvolvimento de variedades com grãos de alto valor nutritivo. Os estudos com arroz evoluíram de tal maneira que esta espécie foi indicada como planta modelo em pesquisas genômicas, representado as monocotiledôneas (Izawa & Shimamoto, 1996), devido ao seu genoma ser um dos menores dentro da família das Poaceas (440 Mbp) e por sua íntima relação com os principais cereais: aveia, milho, sorgo, trigo e cevada (Sandhu & Gill, 2002; Bennetzen & Ma, 2003).

De todos os elementos minerais requeridos pelas plantas, o N é necessário em maiores quantidades e mais freqüentemente limita o seu crescimento. O nitrogênio está disponível no solo em varias formas sendo amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) as mais importantes para as plantas e primariamente absorvidas via sistema radicular (Williams & Miller, 2001). Atualmente, problemas relacionados ao custo destes fertilizantes nitrogenados e a poluição por nitrato (NO_3^-) têm levado à seleção de variedades vegetais que absorvam e metabolizem o nitrogênio (N) do solo mais eficientemente.

Uma vez no interior da célula, o NO_3^- pode ser reduzido, estocado no vacúolo ou translocado para outros órgãos. O primeiro passo na redução é realizado no citossol pela enzima Nitrato Redutase (NR) produzindo nitrito, que entra nos plastídios (cloroplasto na parte aérea) e é reduzido a NH_4^+ pela Nitrito redutase (NiR). O amônio é fixado pelo sistema Glutamina sintetase/Glutamato sintase (GS/GOGAT) em aminoácidos (glutamina/glutamato) os quais servem como substrato para reações de transaminação para produzir outros aminoácidos (Tischner, 2000).

A maior eficiência do uso de nitrogênio (EUN), em plantas, poderia permitir a produção sob baixo nível de fertilização nitrogenada. Para que este objetivo seja alcançado é necessário o melhor entendimento do controle fisiológico, bioquímico e molecular da absorção de NO_3^- (Harrison et al., 2004).

Souza et al. (2002) observaram que a aplicação de N pós-antese pode aumentar o teor de proteína nos grãos sem alterar a produção, do mesmo modo, a remobilização do NO_3^- do vacúolo poderia exercer o mesmo papel, fornecendo N que seria direcionado para o aumento do teor de proteína nos grãos. Em trabalhos anteriores, Souza et al. (1993, 1998, 1999) demonstraram que o aumento da atividade de enzimas de assimilação de N ou aplicação suplementar de N poderiam aumentar os teores de proteína dos grãos de arroz. Estudando as bases genéticas e bioquímicas da eficiência de uso de N em milho, Hirel et al. (2001) encontraram correlações significativas entre características fisiológicas (atividade das enzimas

nitrito redutase e glutamina sintetase, teores de nitrato na parte aérea de plântulas de milho) e características agrônômicas (produção, peso de grãos) e. Em continuidade a este trabalho, Gallais e Hirel (2004) enfatizaram que estas correlações foram dependentes do nível de fertilização nitrogenada. Estes autores descrevem que sob alto nível de nitrogênio, a EUN foi explicada pela variação da capacidade de absorção de N, enquanto sob baixo nível de fertilização, esta foi atribuída a variação da eficiência na utilização de N.

Nas últimas décadas, a combinação de estudos agrônômicos e fisiológicos com a genética quantitativa tem possibilitado o uso de marcadores moleculares para identificar *loci* regulatórios ou estruturais envolvidos na expressão de uma característica quantitativa (QTL). Hirel et al. (2001), encontraram correlações entre QTLs para conteúdo de nitrato e QTLs para produção e peso de grãos. Mais interessante, foi o grande número de QTLs coincidindo com o locus que codifica para *gln4*, uma isoforma de GS citossólica, e dois QTLs para atividade de GS e NR, sendo a correlação negativa para NR em relação aos outros. Neste trabalho, é evidenciado que os genes que codificam a GS podem ser bons candidatos ao controle de EUN. Além disso, esses autores apontam nesse trabalho que fatores como baixa atividade da NR, a alta atividade da GS e o conteúdo de nitrato são bons indicadores da capacidade de produzir e acumular N nos grãos. Estes parâmetros podem ser utilizados para seleção de plantas com alta eficiência no uso de N. Em continuidade a este trabalho, Martin et al. (2006) mostraram o papel de duas isoformas de GS1 (GS1.3 e GS1.4) em milho, em que, plantas transgênicas com supressão da isoforma GS1.4 apresentaram redução do peso de grãos enquanto plantas transgênicas com supressão da isoforma GS1.3 apresentaram reduzido número de grãos. Neste trabalho, o papel de cada isoforma foi independente, e a supressão simultânea das duas isoformas causou uma drástica redução na produção.

A formação de reserva de NO_3^- , nos vacúolos, é um fenômeno controlado geneticamente, e além de outros fatores, é dependente de uma baixa atividade da NR na fase vegetativa. É essencial acumular esse nutriente, pois será de fundamental importância nas etapas posteriores de assimilação de N e produção de grãos.

Em experimento comparando duas variedades de arroz, IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional), quanto a remobilização de N durante o período reprodutivo, observou-se que a variedade tradicional foi mais eficiente na utilização de N acumulado e menos dependente do N proveniente de fontes externas, indicando um processo de adaptação ao fluxo instável de N que ocorre na região do trópico úmido (Souza et al., 1998). Nestas circunstâncias, aparentemente, a capacidade da variedade Piauí em absorver e acumular NO_3^- e sua menor atividade da NR nas fases iniciais de crescimento e até a antese, podem ser os mecanismos que permitem a esta variedade uma elevada produção de N nos grãos (Rodrigues et al., 2004). Neste trabalho foi observado um aumento do teor de nitrato no tecido, quando foi simulada a perda de nitrato por lixiviação (simulando o fluxo sazonal de nitrato que ocorre nos trópicos), atribuindo este fato a absorção de nitrato por meio do sistema induzido de alta afinidade (iHATS).

O NO_3^- é considerado a mais importante fonte de N mineral para o crescimento de plantas em solos aeróbicos. As plantas adquirem NO_3^- da solução do solo, absorvendo-o através de transportadores específicos localizados na membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz. A capacidade de rápida absorção e acúmulo de NO_3^- , na fase inicial de crescimento, pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo, principalmente quando do enchimento dos grãos, e podem ser a razão do alto acúmulo de N nos grãos. Desse modo, a maior eficiência de aquisição de NO_3^- , a partir de baixas concentrações na solução externa pode ser uma indicação de adaptação às condições de estresse nutricional (fluxos instáveis de N), como o decorrente da disponibilidade sazonal de NO_3^- em regiões tropicais.

Durante o período reprodutivo espera-se que o NO_3^- acumulado nos vacúolos e o N remobilizado de outras partes da planta sejam direcionados para o desenvolvimento dos grãos, o que torna necessário o estudo das modificações metabólicas que ocorrem nestas circunstâncias, relacionadas principalmente com as enzimas de assimilação de N e carbono, envolvidas nestes processos. Segundo Masclaux et al. (2000), tanto os transcritos gênicos como a atividade das enzimas Glutamina sintetase citossólica (GS1), Glutamato desidrogenase (GDH) e Proteases aumentam durante o período reprodutivo. Estes autores também observaram que durante a senescência houve diminuição das enzimas cloroplásticas GS2, Glutamato sintase (GOGAT) e RUBISCO, resultado provavelmente da hidrólise das proteínas dos cloroplastos, que ocorre nesta ocasião.

Estudos anteriores demonstraram que um grupo de variedades de arroz, tradicionalmente cultivadas no estado do Maranhão por pequenos produtores, apresenta alta eficiência na utilização de nitrogênio. Este grupo de plantas apresenta uma grande variabilidade genética (Baptista, 2002), algumas resistentes a degrana e acamamento, algumas apresentam elevada produtividade, e praticamente todas são tolerantes ao alumínio tóxico (Mendonça, 1991). Dentre algumas dessas variedades que foram estudadas pelo grupo de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ, algumas apresentaram elevado teor de proteína bruta nos grãos, até 14%, enquanto a média em arroz é em torno de 6%, mantendo uma produtividade de 80% ou igual à de variedades melhoradas, e grande capacidade de remobilização de N. A variedade Piauí possui alta tolerância ao Al^{+3} (Mendonça, 1991), alto teor de proteína bruta (11.2%) e produção de grão semelhante à variedade IAC 47 (Ferraz Jr., 1993; Sousa, 1995). Estes dados indicam que estas variedades desenvolveram mecanismos que as tornaram mais eficientes na aquisição e uso deste nutriente resultando em teores de proteína nos grãos superiores aos encontrados nas variedades melhoradas.

Espera-se que a maior eficiência dessas variedades esteja relacionada a mecanismos de absorção e assimilação de N. A absorção pelos transportadores de nitrato dos sistemas de alta e baixa afinidade bem como o acúmulo e remobilização do N se dariam de maneira mais eficiente para a variedade tradicional quando comparada à variedade melhorada.

Desta forma, nesta dissertação espera-se que alguns dos mecanismos responsáveis por esta eficiência possam ser identificados por meio da análise dos transcritos gênicos envolvidos neste processo por meio da RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction), relacionando estes resultados com a atividade das enzimas de assimilação de nitrogênio e teores das frações solúveis de N e de açúcares livres.

As hipóteses desta dissertação são de que a absorção e o metabolismo de NO_3^- nas plantas de arroz se dão de maneira diferente para variedades tradicionais e melhoradas. Acredita-se que o controle da atividade e expressão gênica das enzimas Nitrato Redutase, Glutamina Sintetase estejam relacionados à maior eficiência na aquisição e uso de N por variedades tradicionais de arroz.

Os objetivos e metas gerais desta dissertação são, portanto, verificar através de RT-PCR, como a expressão de genes que codificam para as enzimas de assimilação de nitrogênio, Nitrato Redutase e Glutamina Sintetase, relaciona-se com a eficiência na absorção e assimilação de N pela variedade tradicional de arroz (Piauí) quando cultivada sob disponibilidade diferencial de nitrato, comparando-a com variedade melhorada (IAC 47), sob idênticas condições de cultivo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nitrato Redutase (NR, EC 1.6.6.1)

A enzima nitrato redutase (NR) catalisa a redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) utilizando NADH ou NADPH como fonte de poder redutor. Esta é passível de ativação e indução pelo substrato (nitrato) e possui meia-vida curta (em torno de três horas). A diminuição no influxo de NO_3^- , e, portanto da quantidade de NO_3^- no citossol (“pool substrato”), pode resultar em queda da atividade da NR. Deste modo, o NO_3^- armazenado nos vacúolos (“pool de reserva”) constitui-se em uma importante reserva, que pode ser posteriormente remobilizada e utilizada para o metabolismo nitrogenado da planta.

A capacidade das plantas de acumular NO_3^- depende do fornecimento desse íon, da atividade da nitrato redutase (ANR) e disponibilidade de carboidratos. Os carboidratos são utilizados para produção de poder redutor e ácidos orgânicos para redução do NO_3^- e assimilação do NH_4^+ produzido, além disso, os carboidratos são utilizados para síntese de ATP necessário para a absorção, nas raízes, e transporte de NO_3^- . Zhongchun e Hull (1998) constataram que a ANR em folhas foi influenciada pela taxa de absorção de nitrato, uma vez que a ANR reflete a circulação de nitrato no citossol das células, não sendo influenciada pelo NO_3^- acumulado no vacúolo (Cookson et al., 2005).

Em arábido, a indução da expressão dos genes que codificam para as enzimas Glutamina Sintetase e NR foi observada após 20 min de exposição a nitrato (Wang et al., 2000). Entretanto, a expressão de transcritos para NR não é controlada apenas por nitrato. Em plantas de tabaco transgênicas, a indução da expressão da NR por nitrato foi observada apenas após o fornecimento de açúcares, mostrando que há influência destes sobre expressão da NR, porém, apenas quando os açúcares atingem níveis críticos (Klein et al., 2000), enquanto que, para GS, houve uma redução de apenas 8% no nível de transcritos antes do fornecimento de açúcares (Masclaux-Daubresse et al., 2002). Nenhuma evidência foi encontrada para se atribuir uma maior influência dos níveis de açúcares no nível de transcritos para NR em plantas crescendo em alta ou baixa intensidade de luz e foto-período normal (Stitt et al., 2002), no entanto, algumas condições de estresse podem reduzir drasticamente a fotossíntese. A assimilação de NO_3^- demanda uma grande quantidade de energia, sendo controlada pelos fluxos internos de energia (Fernandes, 1990). Dessa forma, o controle da NR pelos teores de açúcares previne a redução de NO_3^- em condições energéticas desfavoráveis, com uma rápida resposta a baixos teores de carboidratos e mesmo sob altos níveis de NO_3^- .

A ativação pós-transcricional da NR desencadeada pela fotossíntese tem sido mostrada independente dos níveis de sacarose (Kaiser et al., 1999). Segundo Kaiser e Huber (2001) a concentração de NADH no citosol é dez vezes menor que o K_M de enzima por este podendo limitar a redução do NO_3^- , sendo então dependente da exportação de poder redutor dos cloroplastos. Em plantas de tabaco com supressão de um transportador de 2-oxoglutarato na membrana do cloroplasto foi observada uma baixa de redução de nitrato mesmo as plantas apresentando altos teores de NO_3^- e atividade da NR. Este resultado foi atribuído a uma limitação de substrato para a enzima, provavelmente NADH (Schneidereit et al., 2006). Além disso, o acúmulo de NADH, em plantas mutantes com alta respiração aumentou duas vezes, levou a um significativo aumento na redução de NO_3^- fornecendo evidências de que a disponibilidade de NADH pode ser um fator crítico influenciando a redução do NO_3^- (Duttilleul et al.; 2005).

Harrison et al. (2004) verificaram que linhagens híbridas de *Lótus japonicus* com capacidade diferenciada de acúmulo de NO_3^- apresentavam atividade da nitrato redutase similar, assim o conteúdo de nitrato na parte aérea dessas plantas não pode ser atribuído a diferenças na ANR. No mesmo experimento, foi observado grande acúmulo de transcritos de transportadores de NO_3^- de baixa afinidade (NRT1) e NR, mostrando que a quantidade de transcritos para NR não leva a alta ANR e há outros mecanismos de controle da atividade. A correlação positiva entre conteúdo de nitrato na parte aérea e o nível estável de RNAm que codifica para transportadores de alta afinidade de NO_3^- , sugere que o alto influxo de NO_3^- é devido ao aumento na expressão dos transportadores.

A expressão de um sistema de absorção de alta afinidade aumentou em *Nicotiana plumbagifolia* com baixa ANR, sugerindo sua regulação por formas reduzidas de nitrogênio (Krapp et al., 1998). A expressão dos transportadores de nitrato de alta afinidade, assim como, das enzimas envolvidas na assimilação é controlada pelo próprio íon de forma positiva e pelos produtos de sua redução de forma negativa. Sivasankar et al. (1997), observaram uma significativa redução no acúmulo de nitrato em plantas de milho quando cultivadas sob baixa concentração de nitrato em meio contendo asparagina e glutamina, porém a altas concentrações de NO_3^- este efeito não foi observado. Estes autores observaram que a concentração de 250 μM de NO_3^- foi capaz de induzir a atividade máxima da NR quando comparada a concentração de 5,0 mM de NO_3^- , sendo que a adição de asparagina e glutamina no meio causou a redução drástica da ANR em ambos os níveis de NO_3^- . Da mesma forma, ocorreu redução no acúmulo de transcritos para NR e NiR. Concentrações maiores que 1,15 μM nas raízes e 0,64 μM na parte aérea para glutamina e maiores que 2,2 μM nas raízes e 3,62 μM na parte aérea para asparagina foram encontradas. Fernandes (1983) encontrou concentrações similares e também superiores em plantas de arroz sob estresse por luz, temperatura e níveis de N.

A redução do NO_3^- pode ser inibida por um efeito direto de asparagina e glutamina, podendo estas amidas inibir a absorção de NO_3^- quando este se encontra em baixas concentrações no meio externo (Sivasankar et al. 1997). Dessa forma a atividade da GS pode influenciar tanto na absorção de NO_3^- através dos HATS, quanto no acúmulo de glutamina reduzindo sua assimilação. Segundo Fernandes & Rossiello, (1995) o excesso de NO_3^- pode ser acumulado no vacúolo ou transportado para a parte aérea, mantendo o mesmo nível de ANR. Em gramíneas, as bainhas seriam bons locais para o armazenamento de NO_3^- , devido a essas serem tecidos de baixa atividade metabólica, sem grandes variações de translocação de outros solutos através de tonoplasto, como observado por Santos (2006) em arroz.

2.2 Glutamina Sintetase (GS, EC 6.3.1.2)

A Glutamina Sintetase catalisa a etapa chave da assimilação do nitrogênio inorgânico que é a incorporação do amônio ao glutamato produzindo a glutamina. A glutamina é então utilizada como doador de grupamento amino para síntese de um grande número metabólicos essenciais como aminoácidos, ácidos nucléicos, açúcares aminados. Assim, a síntese de glutamina pela GS de plantas é considerada base da produtividade das plantas (Unno et al., 2006). Por esta razão, a importância da GS é comparável com a importância da Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase/Oxigenase (RUBISCO), a enzima responsável pela assimilação de carbono (Buchanan et al., 2000). Há dois tipos de GS nas plantas, divididas assim em duas famílias: GS1 (citossólica) e GS2 (plastídica). As proteínas da família GS1 são codificadas por um grupo de genes variando de dois a seis, enquanto a família GS2 é codificada por apenas um gene (Ireland e Lea, 1999).

Segundo Tabuchi et al. (2005), plantas de arroz possuem três genes homólogos porém distintos para glutamina sintetase citossolica (GS1). Estes três genes são: *OsGS1.1*, *OsGS1.2* (*OsGS_R*) e *OsGS1.3*. *OsGS1.1* foi expresso em todos os órgãos testados, com grande expressão no limbo foliar, enquanto que *OsGS1.2* e *OsGS1.3* foram expressos principalmente em raízes e espiguetas, respectivamente.

Em tecidos verdes, com alta taxa fotossintética, a isoforma GS2 encontra-se em maior proporção, além de ser responsável pela maior porcentagem da atividade total da GS, principalmente no limbo foliar. Estes resultados têm sido encontrados em milho (Becker et al. 2000), arroz (Yamaya et al., 1992; Zhao et al., 2006) e trigo (Habash et al. 2001), sendo esta enzima responsável principalmente pela reassimilação de NH_4^+ oriundo da fotorespiração. Por outro lado, a GS1 apresenta-se em maior proporção em tecidos com menor quantidade de clorofila, como, por exemplo, em bainhas, tecidos jovens não fotossintetizantes e no citossol de células vasculares participando da assimilação de NH_4^+ resultante da redução do nitrato, atividade proteolítica e do NH_4^+ absorvido do solo (Yamaya et al., 1992; Habash et al., 2001).

Ishiyama et al. (2004) encontraram uma abundante expressão tanto de *OsGS1.1* quanto de *OsGS1.2* em raízes de arroz sob nutrição amoniacal. No entanto, a expressão de *OsGS1.1* ocorreu na epiderme e exoderme sob condições limitadas de N, enquanto *OsGS1.2* foi expressa no mesmo tecido, porém, em condições normais de suprimento de N, preenchendo a perda de *OsGS1.1*. Zhao et al. (2006) observaram a expressão destes genes tanto na parte aérea quanto nas raízes de plântulas de arroz, no entanto, nas folhas, a expressão dos genes *OsGS1.1*, *OsGS1.2* assim como *OsGS2* aumentaram com o aumento do nível de nitrogênio na solução nutritiva, enquanto que, a expressão nas raízes não aumentou ou então diminuiu. Neste trabalho, Zhao et al. (2006) também observaram um perfil de expressão diferenciado destes genes em resposta à forma de N. A expressão de *OsGS1.2*, ao contrario de *OsGS2*, aumentou sob fornecimento de NH_4^+ e diminuiu sob o fornecimento de NO_3^- , enquanto que, o fornecimento tanto de NH_4^+ quanto de NO_3^- após 2 de privação de N, diminuiu a expressão de *OsGS1.1* nas raízes das plântulas.

Plantas de arroz mutantes, pela inserção de um retro-transposon causando a transcrição de um RNAm para *GS1.1* anormal, apresentaram severa redução na taxa de crescimento e no enchimento de grãos quando cultivadas sob fornecimento normal de nitrogênio (Tabuchi et al. 2005). Nessas plantas o “pool” de glutamina nas raízes e parte aérea (PA) foi menor do que nas plantas normais. Quando o gene para *GS1.1* foi de novo inserido, as plantas recuperaram o fenótipo normal, estes resultados mostram que a *GS1.1* tem grande importância para o crescimento normal e enchimento de grãos em arroz; e *GS1.2* e *GS1.3* não são capazes de exercer a função da *GS1.1*. Habash et al. (2001) também observaram o maior desenvolvimento, peso e nitrogênio nos grãos em plantas de trigo transgênicas para super expressão de *GS1*.

A localização de QTLs para características agronômicas como produção, peso de panícula, número de perfilhos e números de espiguetas próximos ao gene que codifica para *OsGS1.1*, indicam uma grande importância da *OsGS1.1* em arroz (Obara et al., 2001). Isto infere que *OsGS1.1* é sem dúvida um importante componente na rota de síntese de glutamina em folhas de arroz. E como sugerido por Ishiyama et al. (2004), *OsGS1.2* (também chamada de *GS_r*) é provavelmente importante na assimilação primária do NH_4^+ absorvido pelas raízes.

Plantas de tabaco transgênicas com a super expressão de *GS1*, quando cultivadas sob condições ótimas de N não diferiram fenotipicamente de plantas normais, porém tinham uma atividade de GS seis vezes maior. No entanto, quando o N foi suprimido, as plantas transgênicas apresentaram um aumento em peso seco de 70% para a parte aérea, 100% para raízes e 50% para a área foliar (Fuentes et al., 2001). Estas plantas mantiveram o nível de fotossíntese igual ao de plantas sob fornecimento normal de N, enquanto que plantas não

transgênicas apresentaram uma redução de 40 a 50% na taxa fotossintética quando na ausência de N. Em trigo, variedades tolerantes a baixos níveis de N no solo apresentaram atividade de GS superior a variedades não tolerantes e a atividade da GS foi proporcional a capacidade destas plantas de remobilizar N para os grãos (Richey et al., 2006). Estes estudos apontam a GS1.1 como o maior determinante na reciclagem e uso de nitrogênio em plantas.

Em plantas de *Heliathus annuus* sob estresse salino, o aumento na expressão e atividade de GS1 foi acompanhado pelos níveis de amônio, enquanto os níveis de GS2 diminuíram (Santos, et al. 2004). Oliveira e Coruzzi (1999) observaram a indução de GS2 por sacarose em plantas mantidas no escuro. Nestas condições, tanto sacarose quanto glicose e frutose foram capazes de induzir a expressão de GS1 e GS2 de forma similar. Por outro lado, o tratamento com 2-oxoglutarato, um intermediário do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, induziu especificamente a GS1. Em um trabalho com tabaco, Scheible et al. (1997) observaram o aumento nos teores de 2-oxoglutarato em plantas mutantes, com baixa ANR e que dessa forma acumulavam nitrato. Este resultado é interessante, pois pode-se supor uma ligação entre o ciclo dos ácidos tricarbóxicos e efeitos sinalizadores do nitrato, assim como mecanismos de indução da GS1 por NO_3^- e a participação GS1 no metabolismo de nitrato.

Esses resultados indicam a possível função da GS1.1 e a evidência genética para seu papel fundamental na produtividade de plantas de arroz.

2.3 Análise de Expressão Gênica Através de RT-PCR Semi-quantitativa.

O NO_3^- além de ser um nutriente pode agir como sinal alterando e coordenando o metabolismo de carbono e nitrogênio (Crawford, 1995; Scheible, et al. 1997), contribuindo também para a indução de genes envolvidos na absorção de fósforo, potássio, água, respostas a estresse e reguladores de transcrição (Wang et al., 2001). Assim, as plantas podem apresentar múltiplas respostas ao nitrato que promove uma diversidade de efeitos regulatórios capazes de ligar a indução de genes que agem individualmente (Wang et al., 2000).

Nos trópicos, as concentrações de nitrato nos solos, nas camadas superficiais, podem variar rapidamente de zero a 300 mg Kg^{-1} de solo, devido a mudanças climáticas como chuvas (Wetselaar, 1961b). Nessas condições, há a necessidade de um rápido e eficiente ajuste dos mecanismos responsáveis pela absorção, redução e acúmulo de nitrato. Sendo que estes envolvem uma série de eventos interligados, como a indução por nitrato e a repressão por metabólitos de sua redução. Dentre as enzimas do metabolismo de N, a NR e a GS apresentam funções relevantes e devem ser melhor estudadas para se compreender a eficiência de uso de N.

A habilidade da variedade Piauí (tradicional) pode estar relacionada a diferenças na indução e capacidade de alternar entre os sistemas de absorção de nitrato, assim como o controle de outras enzimas envolvidas na absorção e assimilação de NO_3^- .

Eventos como absorção, remobilização, partição de N, acúmulo de proteínas e sua influência na qualidade dos grãos de arroz estão relacionados, e seus mecanismos precisam ser entendidos. Torna-se necessário estudar estes eventos em conjunto com a expressão diferencial de genes, para que seja possível o entendimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares que atuam nestes processos.

Diversas técnicas foram desenvolvidas para avaliar a expressão de genes em tecidos e células, tais como, Differential Display (Liang & Pardee, 1992), SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression” – Análise Serial da Expressão Gênica) (Velculescu et al., 1995), RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) Quantitativo em tempo real (Gibson et

al., 1996), cDNA-AFLP (Bachem et al., 1996), Hibridação Subtrativa Supressiva (Diatchenko et al. 1996).

Dentre esses métodos, a RT-PCR é um dos mais sensíveis e versáteis. Esta técnica pode ser usada para determinar a presença ou ausência de transcritos, para estimar o nível de expressão e para clonar produtos de cDNA sem a necessidade da construção e seleção de bibliotecas de cDNA (Sambrook, 2001), e em particular, no caso de proteínas codificadas por famílias multigênicas (Orsel, et al 2002).

A RT-PCR, em teoria, é capaz de detectar a presença de uma única cópia de uma seqüência na amostra de RNAm. Na prática, no entanto, este nível de sensibilidade está fora de alcance principalmente devido à ineficiência inerentes a primeira fase da técnica, a conversão do RNA em cDNA (Sambrook, 2001).

Na PCR, por ser um processo exponencial de multiplicação de moléculas de DNA ou cDNA, poucas diferenças na eficiência de amplificação entre amostras pode dramaticamente afetar a intensidade do sinal obtido (Sambrook, 2001), prejudicando a comparação do nível de acúmulo de transcritos entre amostra. No entanto este problema pode ser minimizado, mas nunca completamente eliminado, pelo uso de padrões internos. Um método para quantificação de espécies específicas de RNAm através de PCR quantitativa foi demonstrado por Wang et al. (1989), usando um RNA sintético, adicionado à amostra, como padrão interno.

Em alguns trabalhos, são usadas variações da RT-PCR como a RT-PCR quantitativa ou semiquantitativa com o uso de primers (iniciadores) competitivos entre si para o RNAm de interesse e para o RNAm usado como padrão interno, o que torna o trabalho mais complicado devido à construção destes primers. Nestes casos, geralmente é usado como padrão o RNA ribossomal (Ohwaki, et al., 2005; Oliveira e Coruzzi, 1999) que encontra-se em grande quantidade. No entanto, esta técnica pode ser usada de uma forma mais simples, sem o uso de primers competitivos, usando primers para transcrição reversa e amplificação da mesma forma para a seqüência de interesse e para a o RNAm usado como padrão, usando como padrões internos genes constitutivos que não são expressos em níveis muito altos, como o da ubiquitina.

Em arábido, a aplicação de RT-PCR usando primers específicos para dois transportadores de nitrato de alta afinidade pertencentes a família NRT2 revelou que há expressão destes dois genes em plantas jovens aos 10 dias após o plantio, porém não antes (Zhuo et al., 1999). Em milho, foi possível verificar diferenças no nível de expressão de genes que codificam para duas isoformas de H⁺-ATPases, em resposta ao fornecimento de nitrato, usando como padrão interno RNAm do gene que codifica para α -tubulina 5, possibilitando observar a contribuição da H⁺-ATPases para absorção de nitrato por essas plantas (Santi, et al. (2003). Usando a mesma técnica, porém com o RNAm para ubiquitina e actina como controle interno, Quaggiotti, et al. (2003) puderam distinguir o nível de acúmulo de transcritos para transportadores de nitrato de alta afinidade entre variedades adaptadas a condições de fertilidade diferentes.

Assim, a RT-PCR torna-se uma ferramenta simples e de grande utilidade para estudos de expressão gênica, possibilitando verificar não só a presença de transcritos como também fornecer dados do nível de expressão relativa do gene.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do Experimento em Câmara de Crescimento

Duas variedades de arroz, IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional) foram cultivadas em solução nutritiva na câmara de crescimento, do Departamento de Solos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As condições ambientais foram: fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de $220 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura $28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ (diurna/noturna).

As plantas foram submetidas nos primeiros 18 dias de germinação, a uma solução basal de crescimento (solução de Hoagland e Arnon (1955) com $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ a 1,4 mM). Em seguida, estas permaneceram durante 72 h em uma solução sem nitrogênio (solução controle). Passado esse tempo, um grupo de plantas recebeu alta concentração de N- NO_3^- (5 mM), outro grupo recebeu baixa concentração de N- NO_3^- (0,15 mM) e o terceiro grupo permaneceu em solução sem N. As plantas foram submetidas a esses tratamentos três horas após o início do período de luz (Wang et al., 2001).

As coletas foram realizadas antes de aplicar os tratamentos nos tempos 1, 3, 6, 9, 24 e 48 horas após a aplicação dos tratamentos (Figura 1). Amostras de 1g do terço médio de folhas e raízes foram coletadas e armazenadas em etanol 80% para análise de frações solúveis (N- NO_3^- , N- NH_4^+ , N-amino e açúcares solúveis). Outras amostras coletadas da mesma maneira foram armazenadas em nitrogênio líquido para posterior análise de expressão gênica por meio de RT-PCR e utilizadas para as análises descritas a seguir.

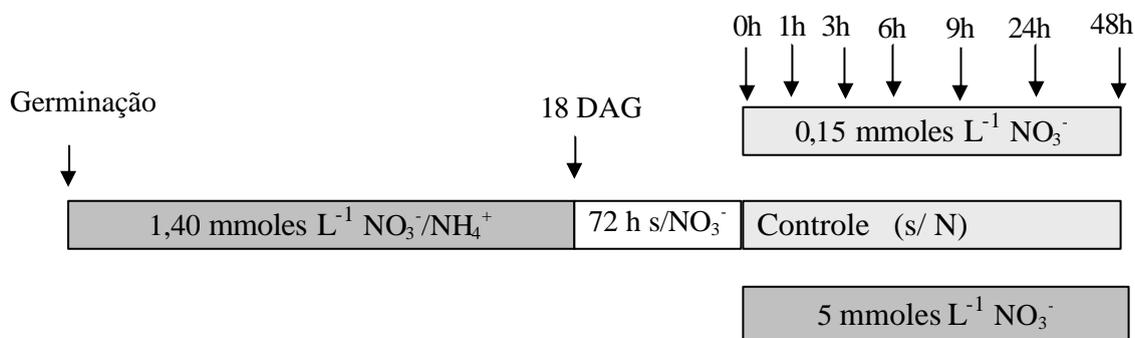


Figura 1. Esquema do experimento realizado para avaliação do metabolismo de N- NO_3^- entre variedades tradicionais e melhoradas de arroz.

3.2 Atividade da Nitrato Redutase

A atividade da Nitrato Redutase (ANR) foi avaliada segundo Jaworski, (1971). Duzentos miligramas de tecido vegetal fresco foram incubados com 5,00 mL de tampão fosfato (0,1 M KH_2PO_4 pH 7,5; 3% N-propanol e KNO_3). Os tubos foram colocados em banho-maria a 30°C por 1 hora no escuro. Em seguida, foram adicionados 0,40 mL da solução problema; 0,30 mL de sulfanilamida 1% em HCl 3M; 0,30 mL de n-naftil-etileno-diamino (0,02%) em outro tubo, deixando-se em repouso por 20 min. Após a adição de 4,00 mL de

água, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, foi utilizado NaNO_2 como padrão.

3.3 Atividade da Glutamina Sintetase

A determinação da atividade da Glutamina Sintetase foi feita segundo Farden e Robertson (1980). Um grama de tecido vegetal fresco foi macerado com N_2 líquido e se acrescentou 4 ml de tampão de extração (0,05M Imidazol-HCl pH 7,9, MgSO_2 , mercaptaetanol). O material foi então filtrado em quatro camadas de gaze e o filtrado foi centrifugado por 15 min a 3 °C e 15.000 xg. O sobrenadante foi recolhido e usado em seguida para determinação de atividade da GS. Para determinação da atividade 0,30 mL de amostra foram incubados em 0,50 mL de Imidazol-HCl (0,1 M) pH 7,5, + 0,10 mL ATP (0,1 M) + 0,1 mL de glutamato (0,5 M) pH 7,5 + 1,0 mL de água destilada. Após 30 minutos em banho-maria a 30°C, a reação foi paralisada com a adição de 1,5 mL de solução de cloreto férrico. As amostras foram centrifugadas e a leitura feita em espectrofotômetro a 540 nm. Foi utilizado γ -glutamilmonohidroxamato como padrão.

3.4 Frações Solúveis

Amostras de um grama de material coletado da parte aérea ou raízes foram homogeneizadas em etanol 80%, e após partição com clorofórmio (Fernandes, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre utilizando ninidrina (Yemm & Cocking, 1955), N-NH_4^+ (Felker, 1977), N-NO_3^- utilizando ácido salicílico (Cataldo et al., 1975) e açúcares solúveis pelo método da antrona (Yemm & Willis, 1957).

3.5 Extração de RNA Total e RT-PCR

Aproximadamente 0,5 grama de tecido de raiz e folhas de arroz foram macerados em gral e pistilo com nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para tubos de centrifuga de 15 mL, novos e estéreis, contendo 1,5 mL de fenol, 1,5 mL de clorofórmio:álcool isoamílico e 4,5 mL de Tampão NTES (0,2 M $\text{Tris-Cl}_{\text{DEPC}}$ pH 8,0; 25 mM $\text{EDTA}_{\text{DEPC}}$; 0,3 M $\text{NaCl}_{\text{DEPC}}$; 2% SDS_{DEPC}). A mistura foi homogeneizada em vortex por 10 minutos e centrifugada em seguida a 8.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o precipitado descartado em recipiente próprio para descarte de fenol. Foi adicionado ao sobrenadante 1/10 volume de 2 M acetato de sódio pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) e 1 volume de isopropanol puro gelado, a mistura foi submetida a -20°C por 2 horas para a precipitação. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 8000 x g por 10 minutos e o precipitado foi lavado com 2,0 mL de etanol ($\text{EtOH}_{\text{DEPC}}$) 70% gelado, sendo centrifugado novamente a 8000 x g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenseo em 2,5 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, adicionando-se em seguida 2,5 mL de 4 M acetato de lítio pH 4,8 ($\text{LiAc}_{\text{DEPC}}$). A mistura foi deixada em uma caixa de isopor contendo gelo, e esta, dentro de uma geladeira, por uma noite.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos e o precipitado foi redissolvido em 0,9 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Depois de dissolvido o precipitado, foi adicionado 0,1 mL de 2 M $\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$ pH 4,8 e em seguida 2 mL de EtOH absoluto a 4°C. A mistura foi colocada a -20°C por 2 horas para a precipitação. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.500 x g por 20 minutos e o precipitado foi lavado com 500 μL de $\text{EtOH}_{\text{DEPC}}$ 70% gelado. Para a lavagem, as amostras foram centrifugadas a 8000 x g por 10 minutos. O EtOH que restou no tubo foi retirado com o auxílio de uma micropipeta sem desfazer o precipitado. Os tubos foram deixados no gelo com as tampas abertas por cerca de

10 minutos para a secagem das amostras, em seguida foram dissolvidas em 100-200 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e transferidas para microtubos novos de 1,5 mL.

Após a extração, o RNA total foi quantificado espectrofotometricamente, assumindo que 1 D.O a 260 nm corresponde a 40 μg de RNA por mL de solução. A qualidade do RNA extraído foi verificada espectrofotometricamente por meio das relações A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} capazes de detectar polissacarídeos/polifenóis (Loulakakis et al., 1996; Shultz et al., 1994) e contaminação por proteínas, respectivamente (Winfrey et al., 1997) e também por meio de sua visualização em gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio.

(a) Tratamento do RNA Total com DNase

A fim de garantir a qualidade do RNA total a ser utilizado na reação de síntese do cDNA, as amostras extraídas foram submetidas a digestão com DNase I (Promega). Foram utilizados na reação de digestão 10 μg de RNA total de cada amostra de RNA, cada reação foi composta por 1 μL de DNase I (10 U μL^{-1}), 17,5 μL de tampão para DNase (4 X) completando-se o volume final para 70 μL com $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos.

Terminada a reação de digestão, foi realizada a precipitação do RNA tratado com DNase. Após o tratamento com DNase, a reação foi elevado a 600 μL com $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$, adicionando-se em seguida 600 μL de fenol. A mistura foi homogeneizada em vortex por 5 minutos e centrifugada a 15000 x g por 5 minutos a 25 °C. Após a centrifugação, 500 μL da fase aquosa (superior) foram retirados e transferidos para um novo tubo, sendo em seguida adicionados 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi homogeneizada em vortex por 3 minutos e novamente centrifugada a 14000 x g por 2 minutos a 25 °C. Após a centrifugação, 400 μL da fase aquosa (superior) foram retiradas e adicionada a um novo tubo, foi colocado em seguida 40 μL (1/10 do volume) de 2 M $\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$ pH 4,8 e 880 μL (2 volumes) de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada em vortex e incubada a -20°C. Após a incubação, a mistura foi centrifugada a 15000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 200 μL de $\text{EtOH}_{\text{DEPC}}$ (70%), centrifugando-se a 13000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e transferido para microtubos novos, acondicionados em gelo com a tampa aberta por 10 minutos para a total eliminação de resíduos de etanol. Em seguida, as amostras foram ressuspensas em 35 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. Após a precipitação, as amostras foram quantificadas novamente no espectrofotômetro para o conhecimento da quantidade de RNA restante após a digestão. Essa leitura é importante para o passo de síntese de cDNA, pois é necessário o conhecimento exato da quantidade de RNA a ser utilizado na reação de síntese da 1ª fita de cDNA.

(b) Síntese de cDNA

A 1ª fita de cDNA foi sintetizada usando “TaqMan Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems), usando primers oligodT de acordo com as recomendações do fabricante, com pequenas modificações: 0,5 μg de RNA total; 3 μL de tampão 10 X TaqMan RT ; 6,6 μL de 25 mM MgCl_2 ; 6 μL de deoxyNTPs; 1,5 μL de primer oligodT; 0,6 μL de RNase Inhibitor; 0,75 μL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U μL^{-1}) e $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ suficiente para completar 30 μL . A reação foi realizada em termociclador, da seguinte forma: incubação por 10 minutos a 25°C, seguida de 30 minutos a 48°C (fase da transcrição reversa) e terminando com 5 minutos a 95°C para inativação da transcrição reversa.

(c) RT-PCR Quantitativo em Tempo Real

As análises de RT-PCR quantitativo em tempo real foram realizadas usando “primers” específicos (Tabela 1) para os genes estudados. Os “primers” foram desenhados com base nas seqüências da região 3'-UTR (3'-não transcrita) do RNAm, exceto para actina, onde não foi possível e por isso foram desenhados com base na região codante (transcrita), utilizando o programa “Primer Express version 2.0” (Applied Biosystems). O gene da actina de arroz foi utilizado como controle constitutivo do experimento. Os produtos de PCR foram detectados com “SYBR[®] Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems).

A reação de “real-time” foi realizada em duplicata, de acordo com as recomendações do fabricante: 5 µL da mistura de “primers” “forward” + “reverse” (totalizando 3,6 µM = 50 µL de cada um dos primers que foram ressuspensos a 7,2 µM); 10 µL de “mix UMM” e 5 µL da reação de síntese da 1ª fita de cDNA. A mistura foi centrifugada na placa a 4000 rpm por 3 minutos e levada para o aparelho de PCR em tempo real (“7500 Real Time PCR System” da Applied Biosystems), as condições da reação de PCR foram a seguinte: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, a curva de dissociação foi realizada a 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos

Tabela 1. Primers específicos usados nas análises de RT-PCR semi-quantitativo.

Gene	Proteína	Forward primer	Reverse primer
OsNia1	NR-NADH	5'-GCGTATGCAAGA TGAGAGAAAAAA-3'	5'-TCATGGCCTATG TATGCAGTATGT AC-3'
OsGln11	GS11	5'-CCACGACATCCT CGTCATC-3'	5'-CCAGCACAAATG CAATTCAC-3'
OsGln12	GS12	5'-GAGTCGTGCTCT CCCTTGAC-3'	5'-CTCATCGACTTGG TGCTGAA-3'
OsGlnI	GSI	5'-ACGGAGCAAAGA GGATTACG-3'	5'-AAAGGACGCGAG AATAAGCA-3'
OsActin	Actina	5'CTTCATAGGAAT GGAAGCTGCGGGTA-3'	5'-CGACCACCTTGAT CTTCATGCTGCTA-3'
OsGln2	GS2	5'-GGCAAATAAAT CCCAGCAAA-3'	5'-TTAACTGGCGAAT GGAAGGT-3'
OsGln2c	GS2c	5'-TGACCGAACTA ATGCCTATTCA-3'	5'-TGATATTCGGTCCG TATTTGG-3'

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de Nitrato em Solução Nutritiva sobre o Metabolismo de Plantas de Arroz

O conteúdo de nitrato, nos tecidos da variedade IAC 47, foi praticamente todo consumido quando mantida em solução nutritiva sem nitrogênio, por um período de 72 horas, ao contrario, após esse período a variedade Piauí ainda apresenta teores de NO_3^- nas folhas e nas raízes (Figura 2 e 3). Na variedade IAC 47, praticamente todo o nitrato foi consumido. Os teores de NO_3^- nos tecidos aumentam gradativamente após o fornecimento desta via solução nutritiva, alcançando valores máximos nas folhas após 9 horas, tendo, no tratamento de 5 mM, um grande aumento nestes teores nas raízes e bainhas após esse período (Figura 4). **Teores de nitrato em bainhas de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM e 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio), após 72 horas em solução nutritiva sem N. As setas indicam o momento em as plantas foram submetidas a solução sem N.** A variedade Piauí apresentou maiores teores de nitrato nas folhas em todos os tratamentos, não havendo diferenças entre variedades nos teores de NO_3^- nas raízes e bainhas independente do tratamento (Figura 3, 4).

Os teores de nitrato nas folhas da variedade Piauí parecem indicar que esta variedade possui maior capacidade de armazenar nitrato, ou seja, maior pool de reserva que a variedade IAC 47. Além disso, os teores de NO_3^- nas folhas e raízes da variedade Piauí, após 72 horas sem nitrogênio, sugerem que esta variedade remobiliza o nitrato armazenado de forma mais lenta que a variedade IAC 47. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Santos (2006) e Souza (1998). Em experimento comparando as mesmas variedades de arroz, IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional), quanto a remobilização de N durante o período reprodutivo, observou-se que a variedade tradicional foi mais eficiente na utilização de N acumulado e menos dependente do N proveniente de fontes externas, indicando um processo de adaptação ao fluxo instável de N que ocorre na região do trópico úmido (Souza et al., 1998). Nestas circunstâncias, aparentemente, a capacidade da variedade Piauí para absorver e acumular NO_3^- e sua menor atividade da NR nas fases iniciais de crescimento e até a antese, podem ser os mecanismos que permitem a esta variedade um elevado acúmulo de N nos grãos (Rodrigues et al., 2004). Neste trabalho, Rodrigues et al. (2004) observaram um aumento do teor de nitrato no tecido da variedade Piauí, quando foi simulada a perda de nitrato por lixiviação (simulando o fluxo sazonal de nitrato que ocorre nos trópicos), atribuindo este fato à absorção de nitrato por meio do sistema induzido de alta afinidade (iHATS).

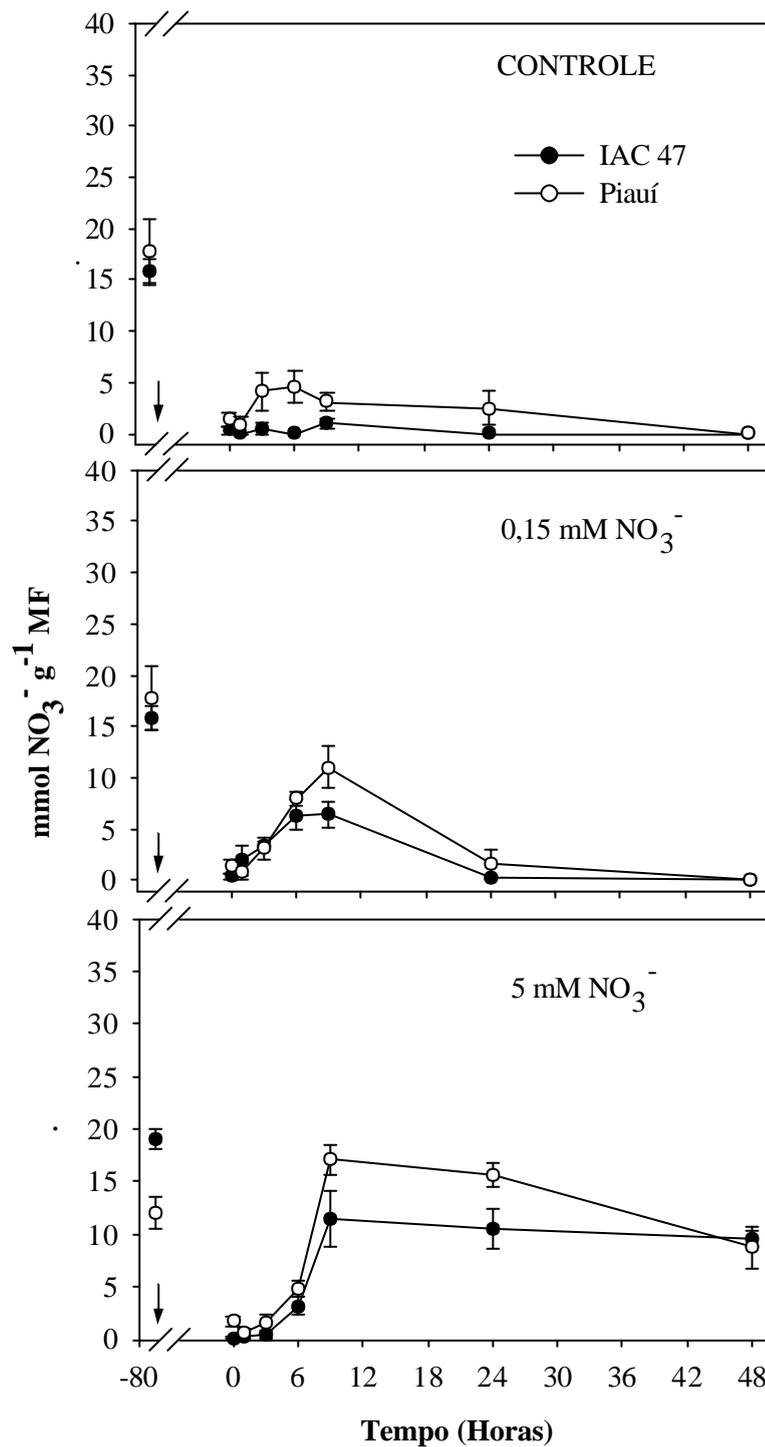


Figura 2. Teores de nitrato em folhas de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM e 5 mM de NO₃⁻ na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio), após 72 horas em solução nutritiva sem N. As setas indicam o momento em as plantas foram submetidas a solução sem N.

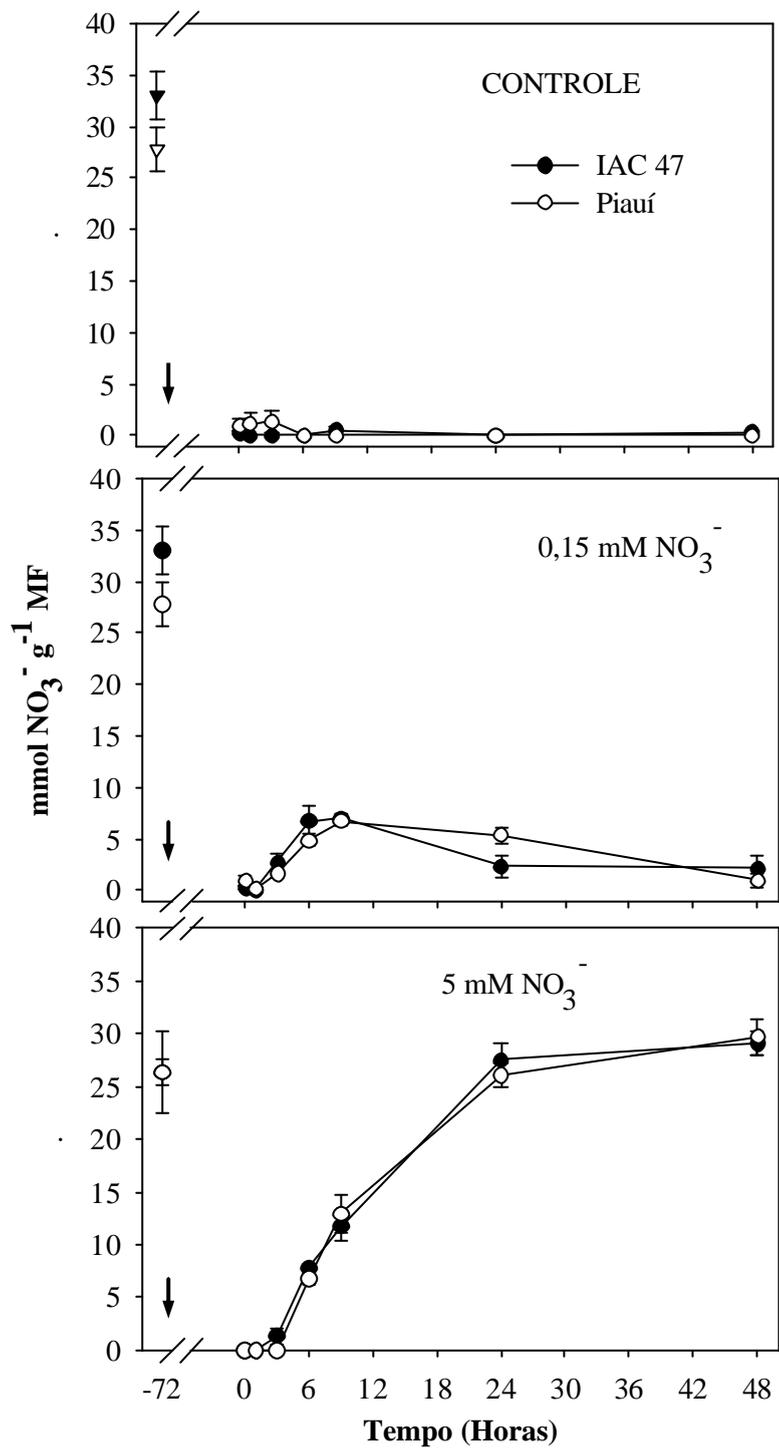


Figura 3. Teores de nitrato em raízes de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM e 5 mM de NO₃⁻ na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio), após 72 horas em solução nutritiva sem N. As setas indicam o momento em as plantas foram submetidas aa solução sem N.

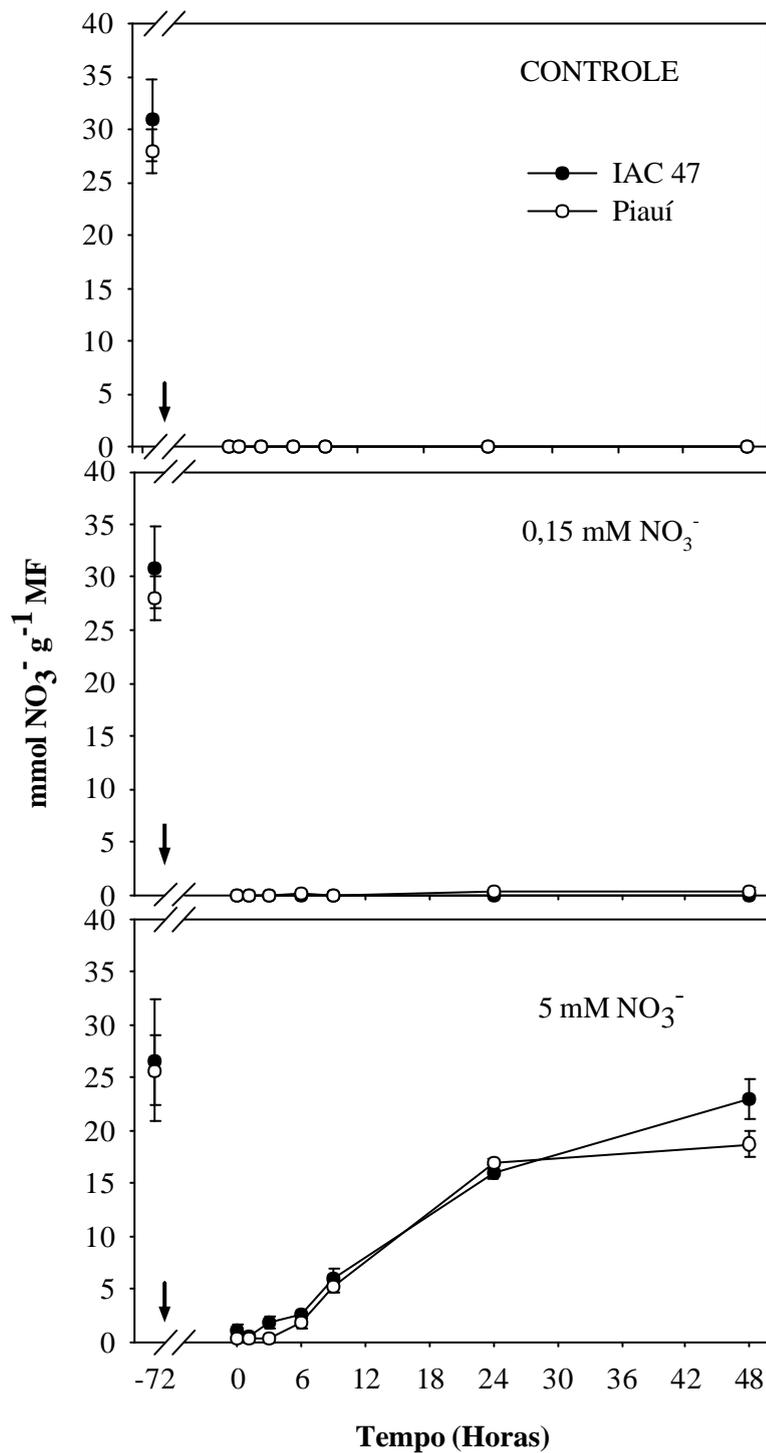


Figura 4. Teores de nitrato em bainhas de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM e 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio), após 72 horas em solução nutritiva sem N. As setas indicam o momento em as plantas foram submetidas a solução sem N.

O cultivo das plantas em solução nutritiva sem nitrogênio por 72 horas causou redução nos teores de aminoácidos totais nos tecidos das plantas (Figura 5). Após o tempo 0 (zero) ocorre um pequeno aumento nos teores de aminoácidos em ambas as variedades. No entanto,

a variedade Piauí apresentou maiores teores de aminoácidos nas folhas após 72 horas sem nitrogênio na solução nutritiva. Isto pode significar que esta variedade está remobilizando e reduzindo o nitrato acumulado nos tecidos (Figura 2). Não há diferença nos teores de aminoácidos entre variedades no tratamento de 0,15 mM de NO_3^- .

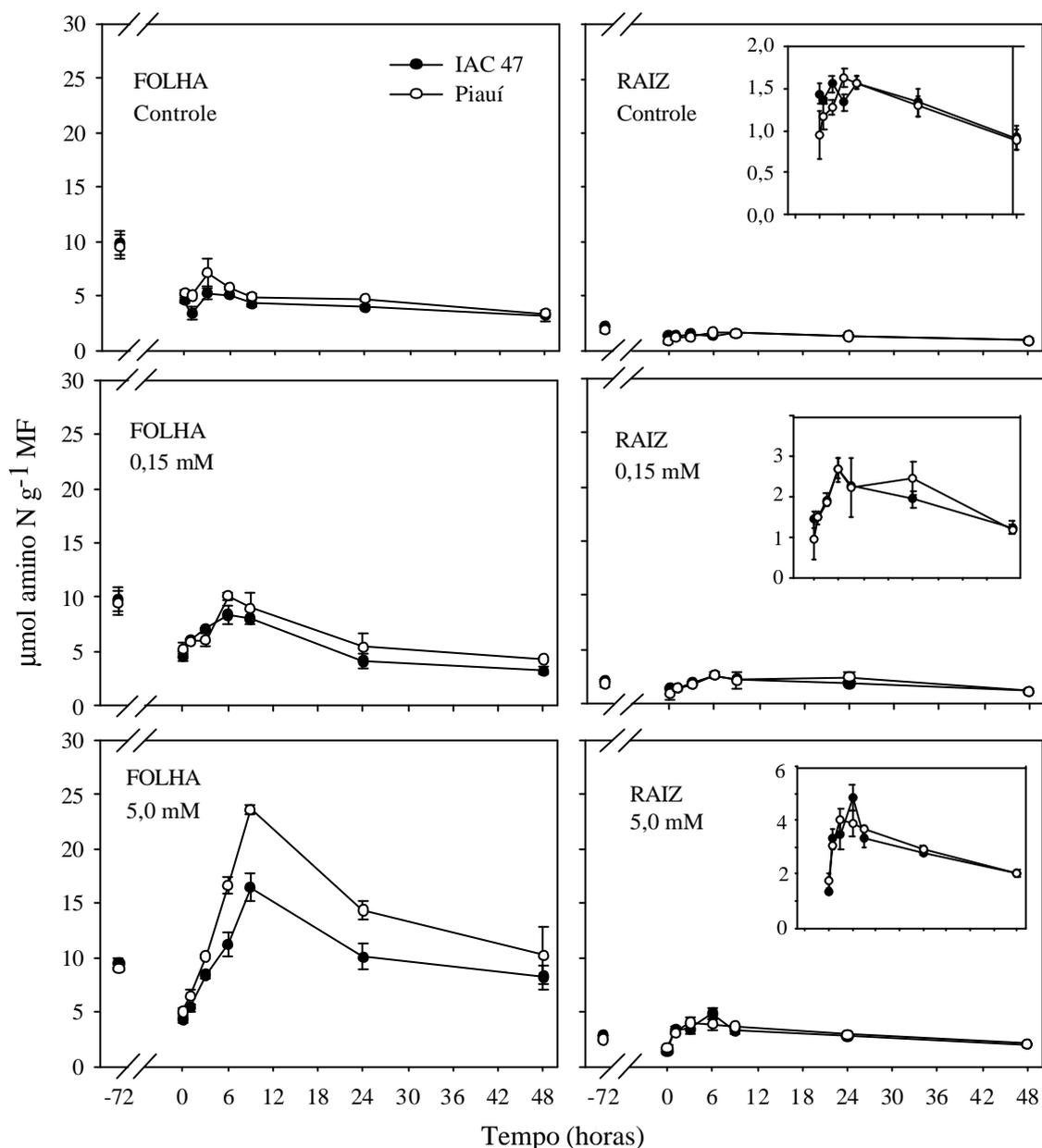


Figura 5. Teores de N-amino em folhas e raízes de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM e 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio). No tempo -72 horas, no eixo X, as plantas foram coletadas antes de submetê-las a solução sem N.

Nas raízes, não houve diferenças nos teores de aminoácidos entre as variedades, no entanto, houve diferenças entre os tratamentos, sendo os maiores valores encontrados no tratamento de maior concentração de nitrato na solução nutritiva. No tratamento de 5 mM ocorreu um grande aumento nos teores de N-amino, sendo estes maiores nas folhas da variedade Piauí comparada à variedade IAC 47 (Figura 5). Em plantas a pleno sol, sob

condições normais, o principal sítio de redução de nitrato são as folhas, sendo assim, o controle da redução de nitrato neste órgão seria fundamental para aumento do acúmulo do nitrato. A nitrato redutase é controlada pelos produtos da redução do nitrato, desse modo o alto teor de aminoácidos, no tecido, pode ser uma estratégia para controle da atividade desta enzima na variedade tradicional. Assim, os teores de N-amino livre na parte aérea da variedade Piauí refletem sua eficiência em absorver e assimilar o N disponível, pois mesmo quando submetida à solução sem N, apresentou maiores teores de N-amino livre que a variedade melhorada .

Elevados teores de N-amino livre podem ter contribuído para o acúmulo de NO_3^- nos tecidos, uma vez que estudos têm demonstrado que o NO_3^- e os produtos da sua redução influenciam sua aquisição e redução. O conteúdo de aminoácido nas folhas geralmente correlaciona-se com o fornecimento de N (Scheible et al. 1997). O aumento nos teores de NO_3^- nos tecidos está relacionado também aos maiores teores de N-amino livre, como demonstrado por Souza et al. (1999). Em cevada foi demonstrada a existência de correlação da atividade da NR com o conteúdo de NO_3^- das folhas, ocorrendo diminuição da atividade da enzima com a redução do conteúdo de NO_3^- nos tecidos foliares. Por outro lado, plantas submetidas a altas concentrações de NO_3^- mostraram alta atividade da NR e níveis elevados de glutamina quando comparadas às plantas submetidas à baixas concentrações de NO_3^- (Man et al., 1999).

Nas plantas mantidas sem nitrogênio há um pequeno aumento nos teores de açúcares solúveis nas folhas de ambas as variedades entre 0 e 9 horas (Figura 6), porém, quando as plantas são submetidas a 0,15 mM de NO_3^- os teores de açúcares mantem-se constantes e no tratamento de 5 mM NO_3^- ocorre uma rápida redução dos teores de açúcares nas primeiras 3 horas após fornecimento de nitrato (Figura 6). Os teores de açúcares solúveis nos tecidos vegetais são indicadores de energia prontamente disponível para o metabolismo celular (Souza, 1995). Além de fonte de energia, os açúcares solúveis são fontes de esqueletos de carbono utilizados na síntese de ácidos orgânicos para a assimilação do nitrogênio reduzido. Assim, os elevados teores de aminoácidos justificam a queda no teor de açúcar solúvel. Os maiores teores de açúcares na folhas da variedade Piauí quando comparada a variedade IAC47 nos tratamentos controle e 5 mM, sugerem que esta variedade possui uma maior eficiência fotossintéticos, não sendo afetada pelo nível de N.

O influxo de NO_3^- é um processo ativo, dependente de um gradiente de H^+ gerado por H^+ -ATPases (Santi et al., 1995) e catalisado por uma combinação de sistemas de transporte de alta e baixa afinidade (HATS e LATS) (Forde, 2000; Galván et al., 2001). Admite-se também que as células invistam mais de 50% das reservas energéticas na manutenção de gradientes iônicos através de membranas (Nelson, 1994). Com isso, a remoção do N-nítrico pode ter resultado em diminuição do consumo de energia sob a forma de açúcares solúveis, o que pode ter resultado no seu acúmulo (Figura 6).

Uma vez que a disponibilidade de açúcares está correlacionada com a demanda energética elevada, as raízes possivelmente utilizariam essa energia para os demais processos metabólicos. Além disso, a redução dos níveis de açúcares solúveis implica em fosforilação da Nitrato Redutase (NR), resultando na inativação dessa enzima (Kaiser e Huber, 2001). Sabe-se atualmente que a disponibilidade de luz e de oxigênio são os fatores externos de maior efeito sobre a regulação da atividade da NR. Por outro lado, açúcares fosforilados ou não são os sinais internos que regulam as proteínas quinase e fosfatase, determinantes do estado de ativação da NR (Kaiser e Huber, 2001), baseado na observação de que a desfosforilação artificial da Nitrato Redutase sempre resultou em maior atividade dessa enzima no escuro (Huber e Kaiser, 1996).

O aumento dos níveis de açúcares solúveis ao longo do experimento foi observado por Man et al. (1999), independente de terem utilizado uma dose baixa (0,3 mM) ou alta de NO_3^- (10 mM), houve queda na atividade da NR e aumento dos níveis de açúcares solúveis.

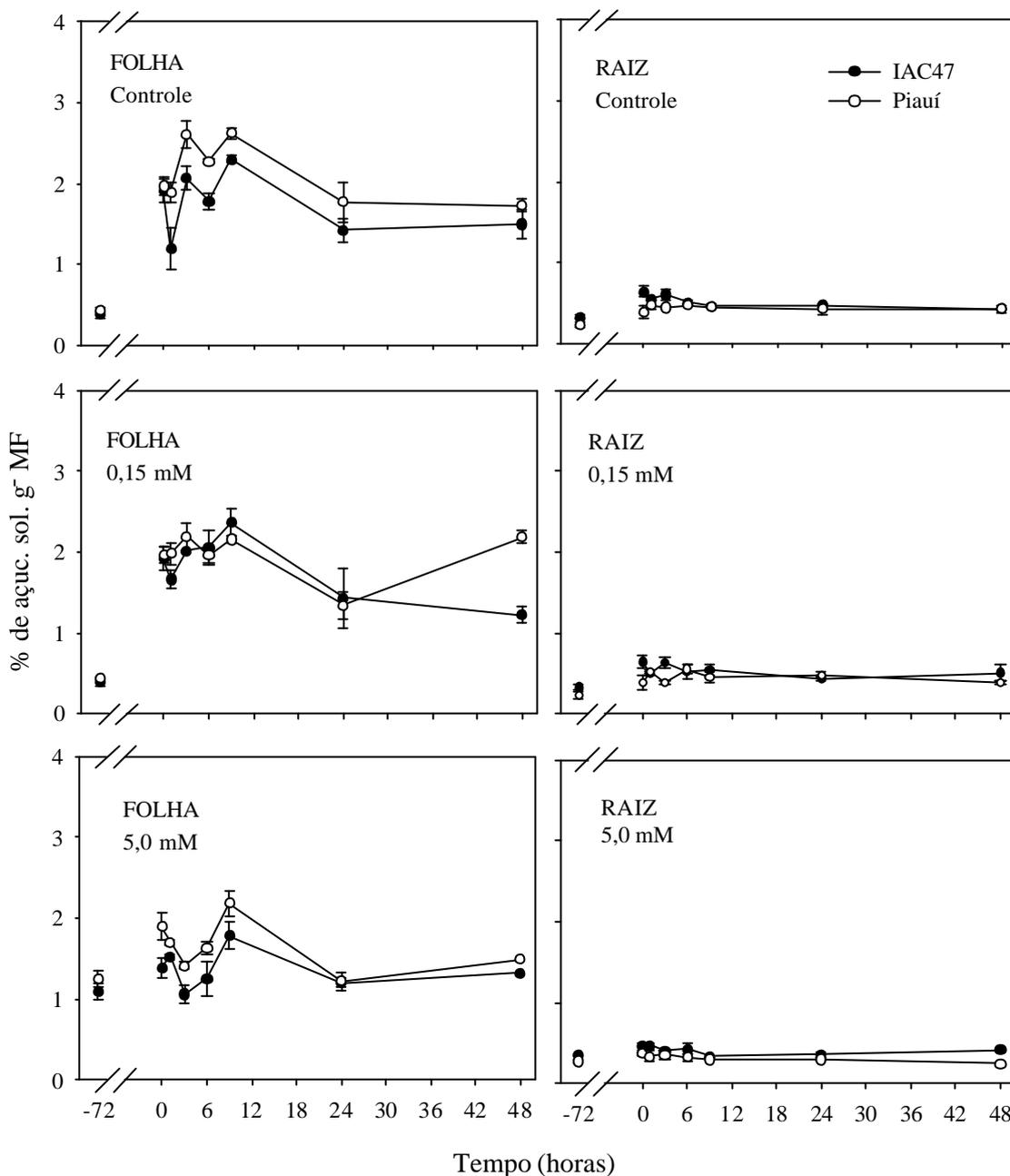


Figura 6. Teores de açúcares solúveis em folhas e raízes de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas 0,15mM e 5 mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio). No tempo -72 horas, no eixo X, as plantas foram coletadas antes de submetê-las a solução sem N.

Os resultados obtidos com a variedade Piauí sugerem que esta adota uma estratégia de maior eficiência de uso do N- NO_3^- , pois acumulou teores mais elevados de N- NO_3^- na parte aérea e teve menor atividade da NR (Figura 7 e 8), levando a crer que o NO_3^- absorvido não está sendo reduzido de imediato, sendo grande parte estocado no vacúolo para posterior utilização. Rodrigues et al. (2004), estudando a variedade Piauí sob “flush” de nitrato também

chegaram a estes resultados. Segundo esses autores, a variedade Piauí mostrou baixa atividade de NR nos estágios iniciais do desenvolvimento, acumulando NO_3^- .

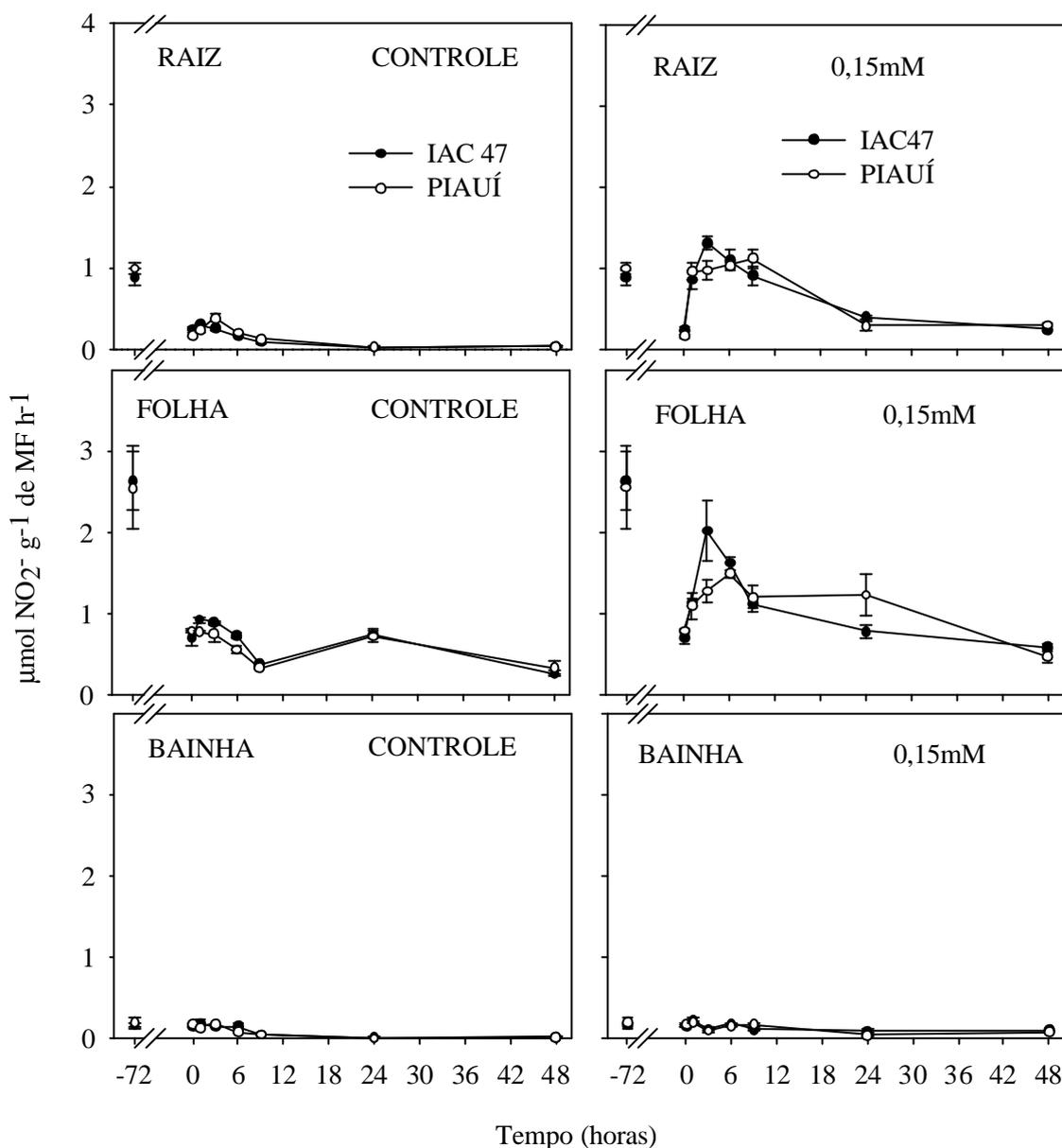


Figura 7. Atividade da Nitrato Redutase em raízes, folhas e bainhas de plantas de arroz, variedade IAC-47 e Piauí, submetidas a 0,15 mM de NO_3^- , e controle (sem N). No tempo -72 horas, no eixo X, as plantas foram coletadas antes de submetê-las a solução sem N.

De fato, a Nitrato Redutase apresenta importância estratégica no metabolismo de N em plantas, pois constitui uma etapa-chave na via de assimilação (Sodek, 2004). O processamento dessa via metabólica implica, pelo menos, no consumo energético de 8 elétrons e na geração de NH_4^+ , o que representa considerável dreno de energia metabólica. Todos os processos que se destinam à assimilação de nitrogênio implicam em grande demanda metabólica de energia (Atkin et al., 2000).

É interessante observar, tanto a 0,15 (Figura 7) quanto 5,0 mM de NO_3^- (Figura 8), que em apenas 1 hora após o fornecimento de nitrato, ocorreu o re-estabelecimento do nível

normal de atividade da nitrato redutase nas raízes. No entanto, apesar de um rápido aumento de atividade nas folhas, esta não atingiu os níveis encontrados às 72 horas antes da retirada do nitrogênio da solução. A variedade IAC47 apresenta um pico de atividade da nitrato redutase 3 horas após a aplicação de 0,15 mM de NO_3^- , tanto em folhas quanto em raízes, enquanto a variedade Piauí mantém a atividade da nitrato redutase em níveis mais baixos (Figura 7). Isto mostra que a variedade IAC 47 reduz rapidamente o nitrato absorvido, mesmo quando sob baixas concentrações do nutriente, enquanto que a variedade Piauí tende a acumular este nitrato apresentando assim maiores teores de nitrato nas folhas.

Há uma atividade inicial elevada que diminui com passar do tempo na atividade da Nitrato Redutase nas folhas das plantas sob 0,15 mM de NO_3^- (Figura 7), enquanto que nas plantas submetidas a 5 mM de NO_3^- a atividade da NR aumenta com o tempo (Figura 8). Isto está de acordo com os dados apresentados na Figura 5, ou seja, as plantas submetidas a menor concentração de nitrato no meio apresentaram menores teores de aminoácidos não tendo controle negativo destes sobre a atividade da nitrato redutase. No entanto, quando submetidas a altas concentrações de nitrato na solução ocorre um grande aumento nos teores de aminoácido em pouco tempo (3 a 9 horas), tendo estes, efeito negativo sobre a atividade da nitrato redutase, nas duas variedades, neste período de tempo. Entretanto, nos tempos de 24 e 48 horas os teores de N-amino diminuem e a atividade da NR aumenta, principalmente na variedade IAC 47.

Santos (2006) observou que as plantas da variedade Piauí apresentam uma maior eficiência de absorção de nitrato quando sob baixas concentrações, o que pode ser responsável pelos altos teores de nitrato no tecido sob condições de lixiviação de nitrato no solo como observado por Rodrigues et al. (2004). Os sistemas de absorção de nitrato de alta afinidade, que atuam sob concentrações de nitrato abaixo de 0,5 mM no meio externo sofrem controle negativo pelos produtos da assimilação do nitrato, dessa forma a alta redução de nitrato nessas condições pode resultar em uma baixa eficiência na absorção deste íon quando sob baixa concentração.

No tratamento de 5 mM de NO_3^- não há diferenças na atividade da Nitrato Redutase entre variedades até as 9 horas após o fornecimento de nitrogênio (Figura 8), no entanto, nos tempos 24 e 48 horas ocorre um aumento da atividade nas folhas da variedade IAC 47, quando comparada com a variedade Piauí, enquanto se mantém nos mesmos níveis na variedade Piauí. Neste caso parece estar ocorrendo um efeito de feedback negativo dos teores de aminoácidos sobre a atividade da Nitrato Redutase. Este efeito negativo, sobre a Nitrato Redutase pode, desta forma, estar contribuindo para que ocorra o acúmulo de altos teores de NO_3^- nas folhas desta variedade (Figura 2).

Assim como a atividade da nitrato redutase, a atividade da Glutamina Sintetase foi maior nas folhas do que nas raízes tanto no tratamento de 0,15 mM quanto a 5,0 mM de NO_3^- (Figura 9 e Figura 10). A bainha foi a parte das plantas que apresentaram menores atividades enzimáticas, mostrando mais uma vez ser este um tecido de baixa atividade metabólica. O fornecimento de nitrato em solução nutritiva na concentração de 0,15 mM não resultou em diferenças na atividade da glutamina sintetase nas folhas quando comparadas com o controle ou entre variedades. A atividade da glutamina sintetase diminui após 24 e 48 horas tanto nas folhas quanto nas raízes das plantas submetidas a 0,15 mM e controle. Esta queda na atividade coincide com o desaparecimento do nitrato (Figura 3) e açúcares solúveis dos tecidos (Figura 6) neste tratamento.

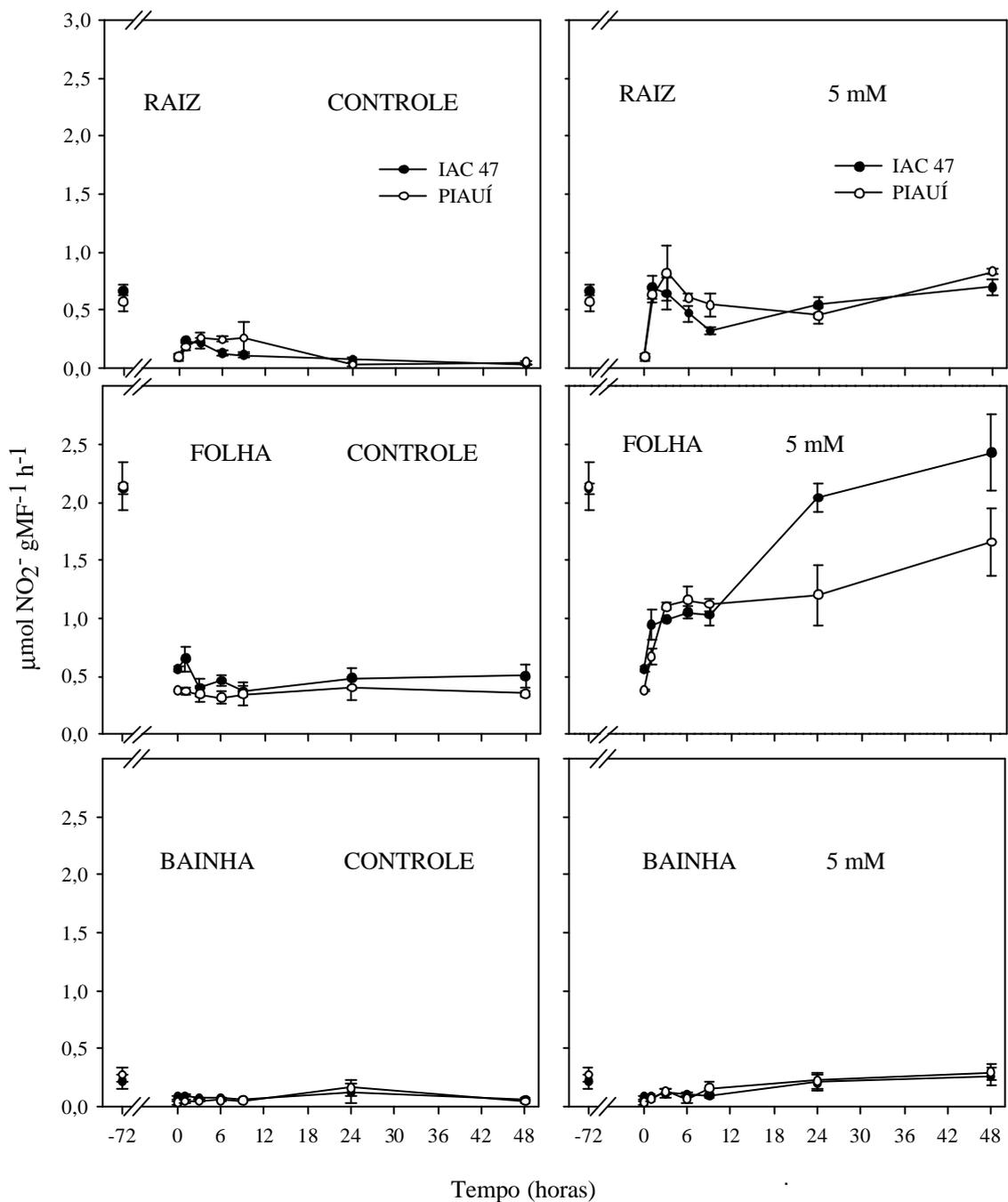


Figura 8. Atividade da Nitrato Redutase em raízes, folhas e bainhas de plantas de arroz, variedade IAC-47 e PiauÍ, submetidas a 5,0 mM NO_3^- e controle (sem N), após 72 horas em solução sem N. No tempo -72 horas, no eixo X, as plantas foram coletadas antes de submetê-las a solução sem N.

O nitrato absorvido pode ser reduzido no citossol e o excesso é armazenado nos vacúolos, enquanto que a atividade da Nitrato Redutase (ANR) reflete a circulação de nitrato no citossol das células, que não são influenciadas pelo NO_3^- acumulado no vacúolo (Cookson et al., 2005). Dessa forma, independente da concentração de nitrato no meio externo, a concentração de nitrato no citossol é a mesma, enquanto que o excesso de NO_3^- provavelmente está sendo armazenado nos vacúolos. Hirel et al. (2001) sugerem que durante a fase vegetativa de crescimento, plantas de milho deveriam manter uma baixa atividade da NR,

de maneira que o NO_3^- acumulado nos vacúolos possa ser posteriormente remobilizado para a produção de grãos. Segundo Gallais & Hirel (2004), alta atividade da NR e eficiência na redução de N indicam genótipos menos eficientes no uso de N.

As bainhas apresentaram a menor ANR independente dos tratamentos. As bainhas são tecidos de baixa atividade metabólica e funcionam como tecidos de reserva. Em nossos laboratórios, Santos (2006), cultivando plantas sob as mesmas condições encontrou resultados semelhantes para nitrato redutase e observou um grande acúmulo de NO_3^- nas bainhas.

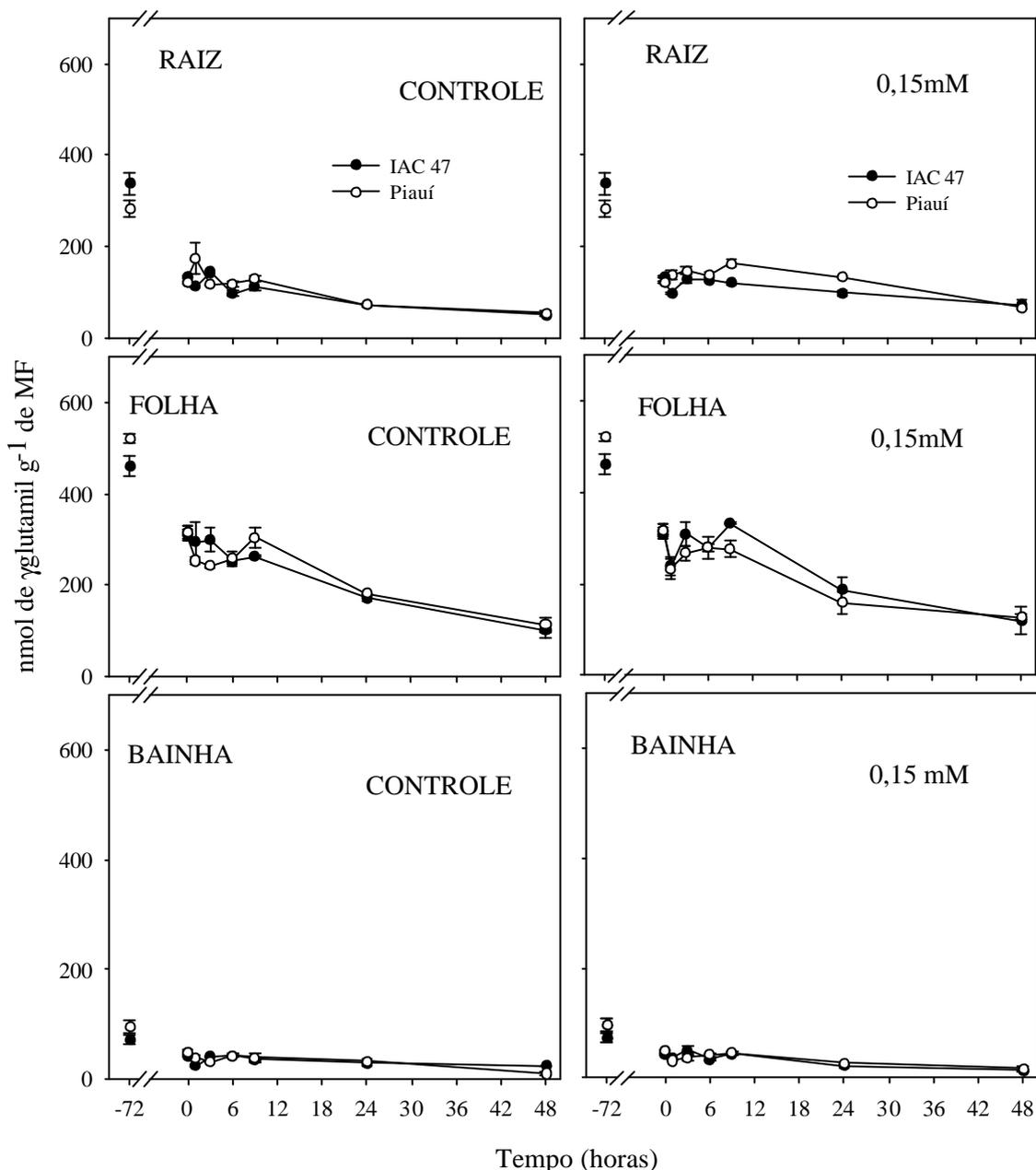


Figura 9. Atividade de Glutamina Sintetase em raízes, folhas e bainhas de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 0,15mM de NO_3^- na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio). No tempo -72 horas, no eixo X, as plantas foram coletadas antes de submetê-las a solução sem N.

O nitrato age como um sinal alterando o metabolismo da célula (Sitt, 2000), podendo desta forma induzir ou reprimir genes de diferentes rotas metabólicas. Dentre as vias metabólicas que sofrem estímulo do nitrato estão algumas enzimas do metabolismo de carbono e dos ácidos orgânicos. Dessa forma, a relação entre a atividade da glutamina sintetase e os teores de açúcares solúveis provavelmente está ocorrendo pelo aumento no metabolismo de ácidos orgânicos e produção de 2-oxoglutarato, que é o ácido orgânico usado na síntese de glutamina pela glutamina sintetase (Sitt, 2000).

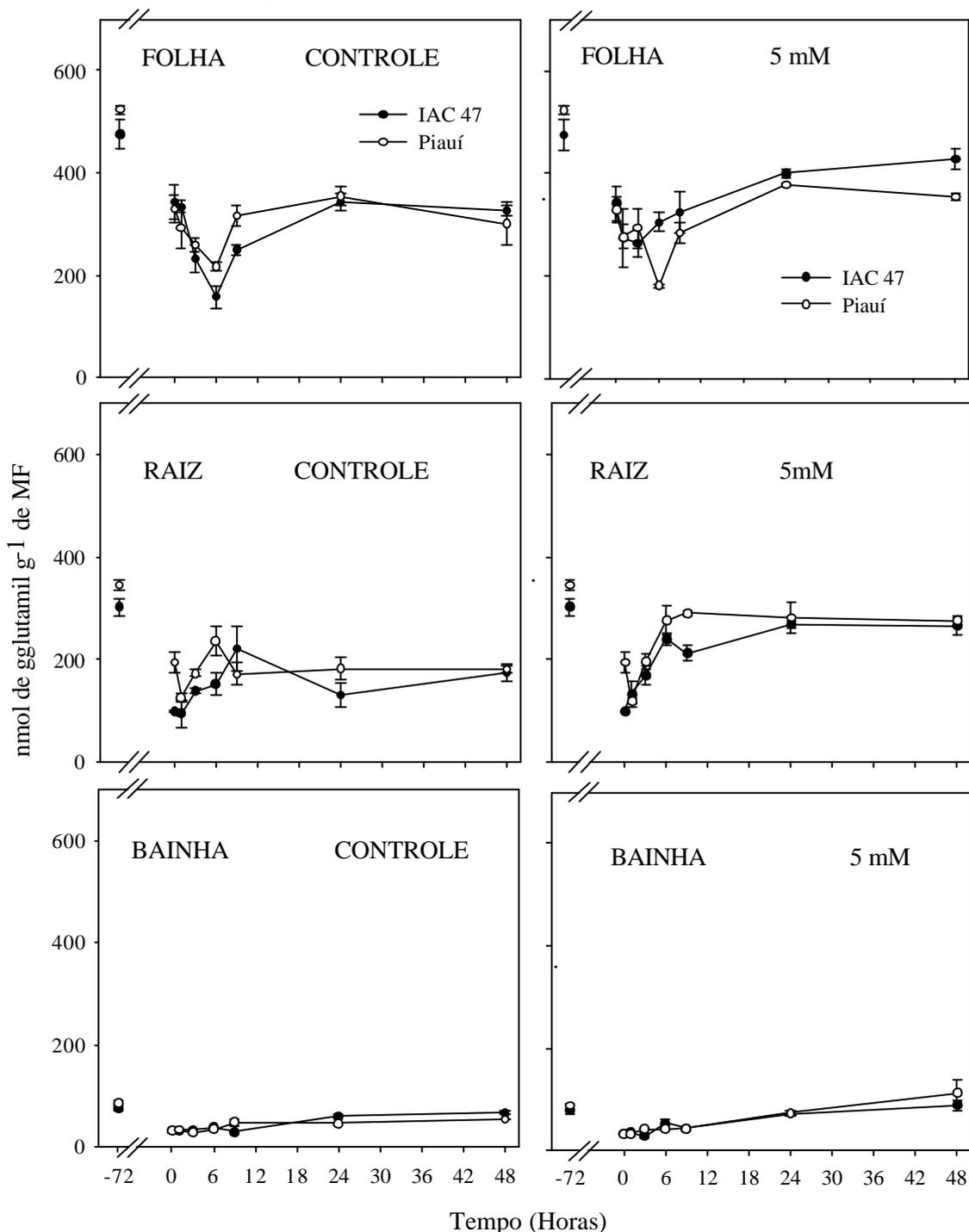


Figura 10. Atividade de Glutamina Sintetase em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz, variedade IAC 47 e Piauí, submetidas a 5 mM de NO₃⁻ na solução nutritiva, e controle (sem nitrogênio). No tempo -72 horas, no eixo X, as plantas foram coletadas antes de submetê-las a solução sem N.

Diferente do tratamento de 0,15 mM de NO_3^- , o de 5,0 mM causou um leve aumento da atividade da glutamina sintetase nas folhas de ambas as variedades (Figura 10), sendo o estímulo maior na variedade IAC 47. Nas primeiras horas após fornecimento do nitrato ocorre uma queda na atividade e após 6 a 9 horas a atividade começa a aumentar. No entanto nas raízes o aumento da atividade é induzido rapidamente após 1 hora na variedade IAC 47 e 3 horas na variedade Piauí.

Nas raízes a indução da atividade da glutamina sintetase foi maior do que nas folhas quando comparamos o controle com os tratamentos contendo nitrato (Figura 10). Na variedade Piauí a atividade da glutamina sintetase supera a variedade IAC 47 em ambos os tratamentos, 0,15 e 5,0 mM de NO_3^- , sendo que mesmo no tratamento controle a atividade na variedade Piauí foi maior do que na variedade IAC 47 indicando que esta variedade apresenta uma melhor utilização do N nesta condição. No tratamento de 5,0 mM ocorre um aumento contínuo de atividade de GS na variedade IAC 47 que coincide com a atividade da nitrato redutase, o mesmo acontece para a atividade de GS na variedade Piauí porém sem aumento de atividade da nitrato redutase. O aumento de atividade neste caso, nas folhas, pode estar ocorrendo pela indução pelo NH_4^+ resultante da redução do nitrato.

Em experimento com arroz, Li et al. (2006) verificaram que o fornecimento de nitrato resultou em aumento da atividade da glutamina sintetase até um período de 24 horas retornando a níveis inferiores após este tempo, não havendo respostas nas folhas. A estreita correlação entre o metabolismo de nitrogênio e carbono nas plantas é relatada a algum tempo em muitos trabalhos. Portanto, uma maior eficiência energética, se traduz quase que obrigatoriamente numa maior eficiência no uso do N, pois os processos de absorção, translocação, redução e remobilização deste nutriente são dependentes de energia metabólica. Há gasto de poder redutor e ATP para as enzimas envolvidas nesses processos. Este resultado é interessante, pois pode-se supor uma ligação entre o ciclo dos ácidos tricarbônicos (metabolismo de carbono) e efeitos sinalizadores do nitrato assim como um dos mecanismos de indução da GS1 por NO_3^- e a participação GS1 no metabolismo de nitrato.

4.2 Expressão dos Genes que Codificam para a Glutamina Sintetase e Nitrato Redutase

Nas raízes das plantas de arroz no tratamento sem N a expressão de *OsGS1.1* representa praticamente toda a expressão e atividade de GS nas raízes (Figura 11 e Figura 12), assim como após o fornecimento de NO_3^- esta continua a ser a isoforma predominante, com exceção da variedade Piauí às 6 horas. Após 72 horas sem N, a variedade Piauí parece apresentar maior expressão de *OsGS1.1* que a variedade IAC 47 (Figura 11), tanto nos tempos 6 horas e 24 horas. Após 6 horas de fornecimento de nitrato ocorre um aumento na quantidade de transcritos para GS1.1 nas plantas da variedade Piauí sob baixo nível de N (0,15 mM de NO_3^-), enquanto que, sob 5 mM após 6 e 24 horas há uma diminuição na quantidade de transcritos. A GS1.2, também chamada de GSr por ser mais expressa nas raízes, apresentou níveis de expressão menores que os de GS1.1, principalmente na variedade Piauí (Figura 11B). Quando o NO_3^- foi aplicado ocorreu aumento de expressão de GS1.2 apenas na concentração de 5 mM para a variedade Piauí nos tempos 6 e 24 horas, enquanto na variedade IAC 47, houve aumento na quantidade de transcritos tanto sob baixo como sob alto nível de NO_3^- apenas no tempo de 6 horas.

Em plantas de arroz mantidas sem nitrogênio por 48 horas (Zhao et al., 2006) encontraram o mesmo padrão de expressão de *OsGS1.1* e *OsGS1.2* encontrados neste trabalho, onde as plantas permaneceram 72 horas sem N. No trabalho de Zhao et al. (2006) também foi observada a repressão da expressão de *OsGS1.1*, e *OsGS1.2* após o fornecimento de nitrato em uma concentração de 2 mM, considerado alto nível de N. No entanto, os

resultados de expressão de *OsGS1.2* mostrados por Zhao et al. (2006) não estão totalmente de acordo com os resultados apresentados aqui, sob alto nível de N. Provavelmente, a alta concentração de NO_3^- utilizada neste experimento (5 mM) proporcionou maior síntese de aminoácidos (Figura 13C), isto pode ter contribuído para reações de transaminação levando a síntese de outras aminas ou aminoácidos, o que poderia ocasionar um aumento nos teores de NH_4^+ no citossol, que pode ter sido responsável pela indução de *OsGS1.2* (Figura 11B).

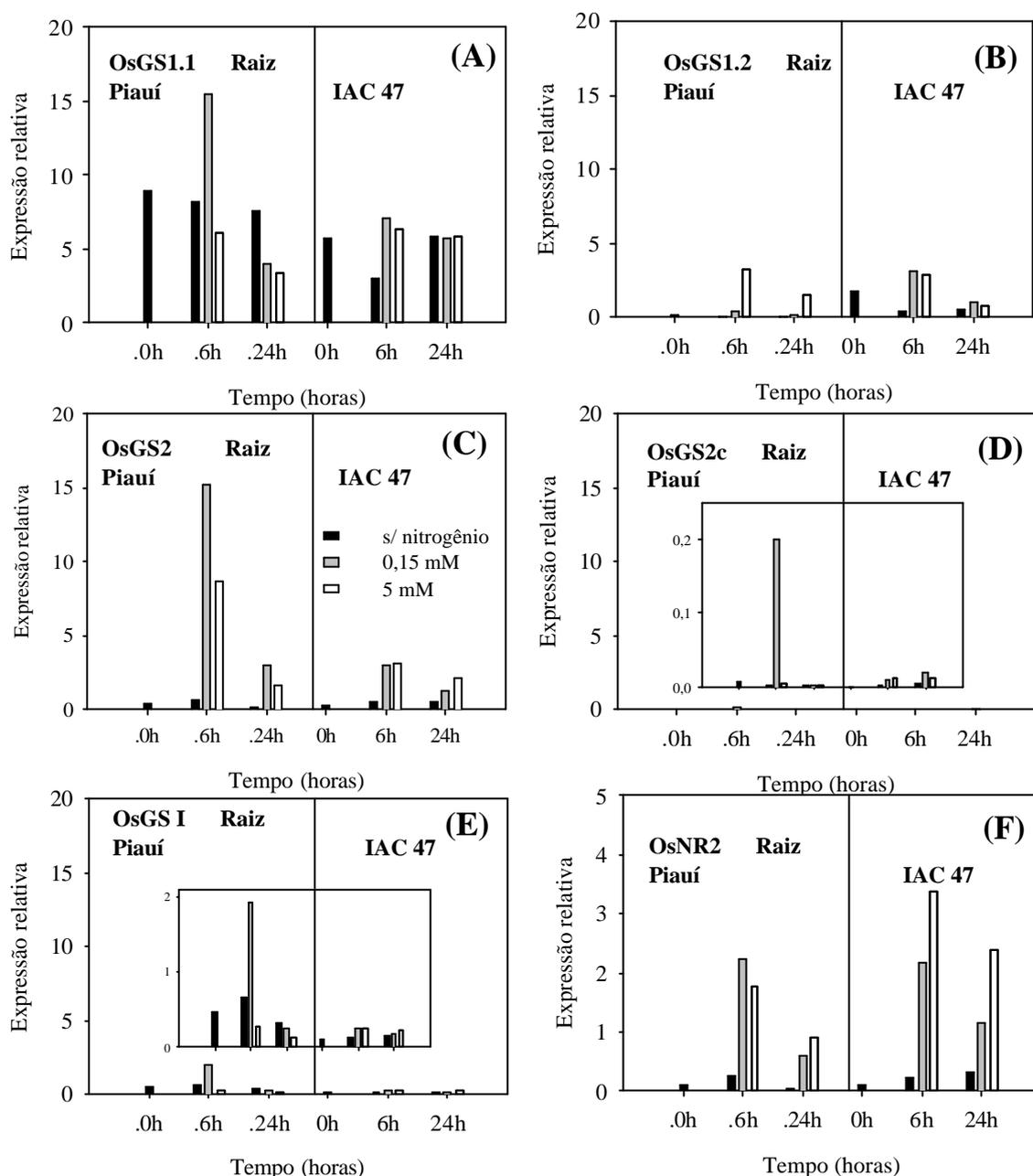


Figura 11. Expressão relativa de genes que codificam para as enzimas Glutamina Sintetase: *OsGS1.1* (A), *OsGS1.2* (B), *OsGS2* (C), *OsGS2c* (D) e *OsGS I* (E) e Nitrato Redutase: *OsNR2* (F) em raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC 47, sob diferentes níveis de nitrato (sem nitrogênio, 0,15 mM e 5 mM de NO_3^-). A expressão do RNAm de actina foi usada para normalizar as amostras.

O passo final de redução do nitrato e assimilação do NH_4^+ envolve reações que ocorrem nos plastídios, devido a isso, a assimilação do N proveniente do nitrato deve ocorre

principalmente pela GS2. Na variedade Piauí observa-se um grande pico no acúmulo de transcritos para GS2 após 6 horas de fornecimento de nitrato (Figura 11C), sendo neste tempo, superior à variedade IAC 47, tanto sob alto como baixo nível de N. No tempo de 24 horas o acúmulo de transcritos é maior na variedade Piauí no tratamento de 0,15 mM de NO_3^- , enquanto que, com de 5 mM de NO_3^- não há diferenças. Deve ser destacado, que na variedade Piauí o maior acúmulo de transcritos para GS2 ocorre sob baixo nível de N, enquanto na variedade IAC 47, não há diferenças às 6 horas, e após 24 horas o maior acúmulo ocorre sob alto nível de N (Figura 11C). Zhao et al. (2006) encontraram resultados semelhantes aos observados para a variedade Piauí, o que pode representar uma preferência de assimilação nas raízes por essa variedade sob as condições do experimento, enquanto que para a variedade IAC 47 parece ocorrer o contrário, o que pode estar relacionado a maior atividade da NR nas folhas desta variedade (Figura 12), concordando com os resultados de Santos (2006).

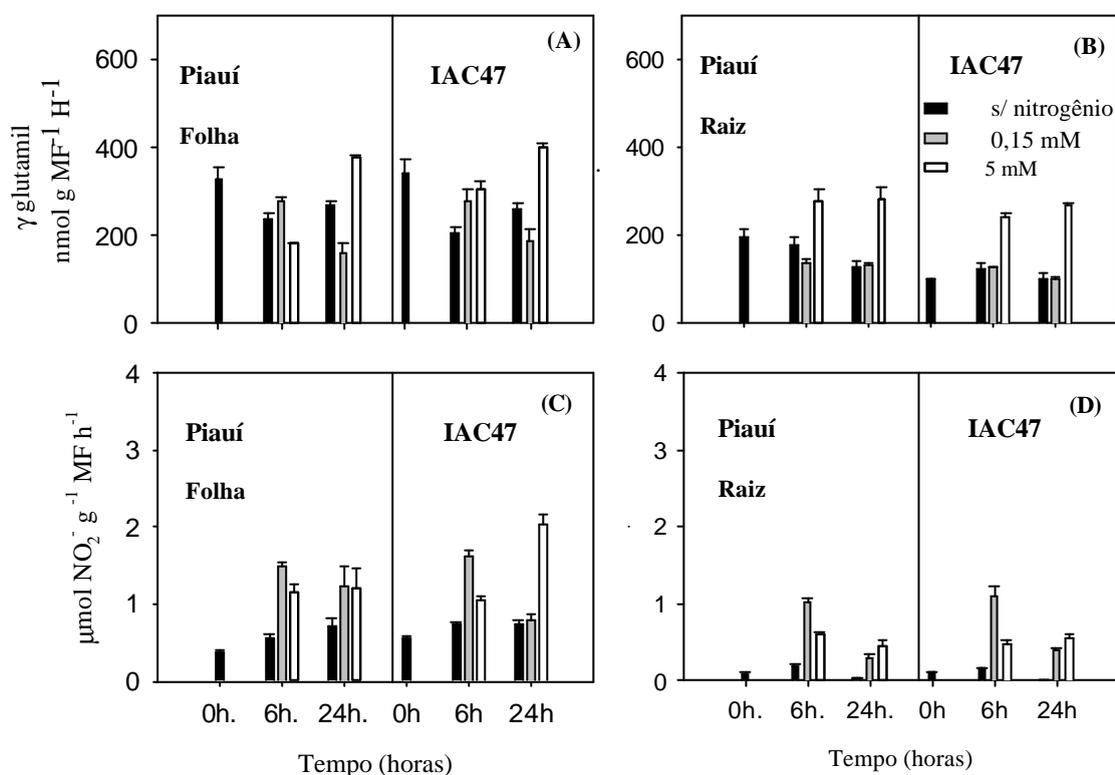


Figura 12. Atividade da Glutamina Sintetase (A e B) e da Nitrato Redutase (C e D) em folhas e raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, nos tempos: 0, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e com 0,15 e 5 mM de NO_3^- .

A forma GS2c resultante do splicing alternativo do RNAm da GS2, apesar de sofrer grande indução por 0,15 mM de NO_3^- para a variedade Piauí (Figura 11D), apresenta um acúmulo extremamente baixo de transcritos quando comparada com as outras isoformas (Figura 11). A origem desse transcrito provavelmente se deve a erros no processamento dos RNAm para GS2, e se for traduzido, provavelmente resultaram em uma proteína não funcional.

Apesar da expressão relativa da isoforma dodecamérica, OsGS I, ser inferior a da GS1.1 e da GS2, foi superior a da GS1.2 sob baixa dose de NO_3^- e também nas plantas sem N, para a variedade Piauí às 6 horas, enquanto que para a variedade IAC 47 a expressão deste gene (OsGS I) nas raízes se dá de forma constitutiva (Figura 11E).

Há um grande aumento no acúmulo de transcritos para NR2 após o fornecimento de NO_3^- (Figura 11F), nas primeiras 6 horas não há diferenças entre as variedades quando sob baixo nível de NO_3^- . No entanto, sob alto nível de NO_3^- , há maior acúmulo para a variedade IAC 47. Após 24 horas o acúmulo de transcritos é maior para a variedade IAC 47 em todos os tratamentos. Na variedade IAC 47 o maior acúmulo de transcritos de OsNR2 se deu no nível mais alto de NO_3^- , enquanto que para a variedade Piauí não há grandes diferenças entre os níveis de NO_3^- . Sabe-se que a expressão dos genes que codificam para nitrato redutase são reprimidos por formas de N reduzido (Klein et al., 2000), como no tempo de 6 horas não houve diferenças nos teores de N-amino (Figura 13D) entre variedades sob baixo nível de N, também não houve diferenças na expressão de OsNR2 neste período. Do mesmo modo, na variedade Piauí, a expressão de OsNR2 é reprimida sob alto nível de N, no qual há um aumento nos teores de N-amino nas raízes (Figura 13D). No entanto, mesmo não havendo diferenças nos teores de N-amino entre as variedades, na variedade IAC 47, ocorre maior expressão de OsNR2, o que sugere que na variedade Piauí ocorre um forte controle transcricional sinalizado pelos teores de N-amino.

As diferenças observadas na expressão de OsNR2 nas raízes, não se refletem na atividade da NR (Figura 14C e D). A nitrato redutase sofre um forte controle, tanto a nível transcricional, quanto pós-traducional por fosforilação reversível e/ou seguida de degradação (Kaiser, 1998), além disso, trabalhos realizados com folhas destacadas de espinafre mostram que em algumas situações a ANR pode não representar a redução atual de nitrato (Kaiser et al., 2000).

Como pode ser observado na Figura 14, de modo geral a expressão de genes para GS e NR foram bem maiores nas folhas do que nas raízes (Figura 11) como também ocorreu para a atividade da GS e da NR (Figura 12). A expressão de OsGS1.1 não apresentou incrementos significativos em relação ao tempo zero, exceto nas plantas sem nitrogênio da variedade IAC 47 no tempo de 24 horas (Figura 14A). Assim como nas raízes, no tempo zero e 6 horas a variedade Piauí apresentou maior acúmulo de transcritos para OsGS1.1 que a variedade IAC 47. No tempo de 6 horas houve um decréscimo no acúmulo de transcritos para GS1.1 sob baixo nível de N nas duas variedades. No tempo de 24 horas, a variedade Piauí mostrou redução na expressão de OsGS1.1 nas plantas sem N enquanto que nas plantas com N, a expressão não se alterou, enquanto que na variedade IAC 47 há um aumento nas plantas sem N e sob baixo nível, enquanto sob alto nível de N a expressão não se altera. A expressão de OsGS1.1 parece não sofrer indução pelo fornecimento externo de NO_3^- (Figura 14A). A atividade de GS no citossol das folhas é responsável principalmente pela assimilação do NH_4^+ produzido na quebra de proteínas, o que justifica não haver aumento de expressão do gene OsGS1.1 em resposta ao fornecimento externo de N, mas sim durante a senescência (Hayakawa et al. 1993, Purcino et al. 1999) ou sob condições de déficit de nitrogênio, quando ocorre a quebra de proteínas para a translocação de N para órgãos em desenvolvimento .

Ao contrário de OsGS1.1 e OsGS2, o acúmulo de transcritos para a OsGS1.2 nas folhas (Figura 14B) foi bem menor quando comparada com as raízes (Figura 11B), o que confirma as raízes como local preferencial para expressão deste gene. Ocorre um aumento na expressão após 6 horas do início do experimento tanto nas plantas com N como nas plantas sem N da variedade Piauí. No tempo de 24 horas ocorre um grande aumento apenas nas plantas sem N. Para a variedade IAC 47 não ocorrem variações no nível de RNAm exceto no tempo de 24 horas e no tratamento de 0,15 mM onde há redução na quantidade de transcritos. A expressão de OsGS1.2, diferente de OsGS2, tem sido observada ser induzida por amônio nas raízes (Ishiyama et al., 2003), no entanto, sob alto fornecimento de N foi observado um nível significativo de expressão deste gene em folhas (Zhao et al., 2006), o que pode ser ocasionado por reações de transaminação e síntese de moléculas com menor relação C/N para economia de esqueletos de carbono.

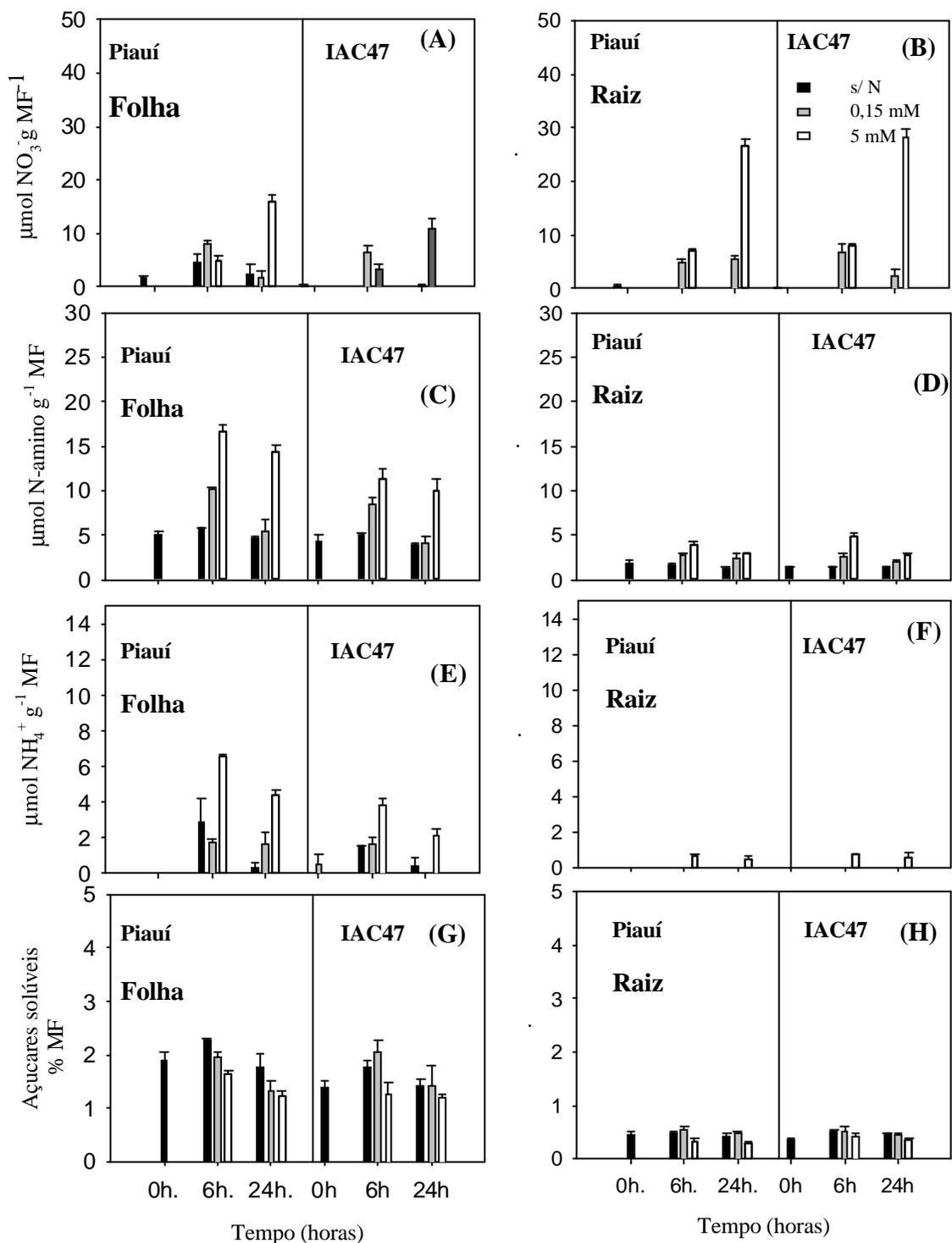


Figura 13. Teores de N-NO_3^- (A e B), N-amino (C e D), N-NH_4^+ (E e F) e açúcares solúveis (G e H) em folhas e raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, nos tempos: 0, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e com 0,15 mM e 5 mM de NO_3^- .

A expressão de GS2 (Figura 14C) no tempo zero não diferiu entre variedades, no entanto as 6 e 24 horas houve redução na quantidade de transcritos nas plantas da variedade

Piauí sem N enquanto que na variedade IAC 47. Houve aumento às 24 horas. Na variedade Piauí a maior expressão ocorreu sob alto nível de NO_3^- , enquanto que no menor nível houve redução às 6 horas e um pequeno aumento às 24 horas. Na variedade IAC 47 a expressão sob alto nível de N é aproximadamente duas vezes menor que na variedade Piauí, tanto as 6 como às 24 horas, sob baixo nível ocorre um grande aumento de expressão após 24 horas. A GS na parte aérea atua principalmente na reassimilação do NH_4^+ produzido nas células do mesofilo durante a fotorrespiração (Husted et al. 2003), ou então, produzido pela redução do nitrato. A indução da expressão de OsGS2 também foi verificada por Zhao et al. (2006) com o fornecimento externo de N, sendo o nível de expressão proporcional ao nível de N, na forma de NH_4NO_3 . A expressão de GS2 pode ser induzida em parte pela luz através do citocromo e em parte pelo status de carbono sinalizado por 2-oxoglutarato. Por outro lado, o fornecimento de NO_3^- pode afetar o metabolismo de carbono, assim com aumentar a síntese de 2-oxoglutarato que por sua vez pode sinalizar para indução da expressão de OsGS2 (Muller et al., 2001; Stitt e Krapp, 1999).

O aumento da expressão de GS2 (Figura 14C) nas folhas da variedade Piauí às 6 e 24 horas está de acordo com o aumento dos teores de NH_4^+ e N-amino (Figura 13 C,E e G). A isoforma GS2 parece ser a principal componente da atividade da GS às 24 horas nas folhas da variedade Piauí.

A expressão da GS I (Figura 14E) foi baixa, no entanto muito maior que a expressão de GS1.2 (Figura 14B). A expressão de GS I é maior na variedade Piauí, no tempo zero, e às 6 horas as duas variedades apresentam resposta semelhante, com aumento nas plantas sem N e sob alto nível de N e redução da expressão sob baixo nível de N. Às 24 horas e sob 5 mM de NO_3^- houve aumento da expressão na variedade Piauí em relação à IAC 47. Apesar de ser encontrada em plantas (Mathis et al., 2000), não há informações sobre expressão ou função desta enzima.

Não houve diferenças na expressão do gene NR2 entre variedades no tempo zero (Figura 14F). A expressão do gene NR2 diminui na variedade Piauí sem N, enquanto que na variedade IAC 47 houve aumento às 24 horas. No tratamento de 0,15 mM não há diferenças na expressão de NR2 na variedade Piauí, enquanto que na variedade IAC 47 ocorreu aumento com o tempo sendo maior às 24 horas. No tratamento de 5 mM houve grande aumento na expressão às 6 horas para as duas variedades, diminuindo às 24 horas. Apesar de não haver diferenças entre as variedades às 6 horas, no tempo de 24 horas a expressão de NR 2 foi duas vezes maior na variedade IAC 47 sob alto nível de N. Sob baixo nível de N, a expressão de NR2 foi de 2 a 4 vezes maior na variedade IAC 47 nos tempos 6 e 24 horas, respectivamente. A maior expressão da NR2 às 6 horas quando ambas as variedades receberam 5 mM de NO_3^- , indica a indução da transcrição gênica pela presença do substrato (nitrato).

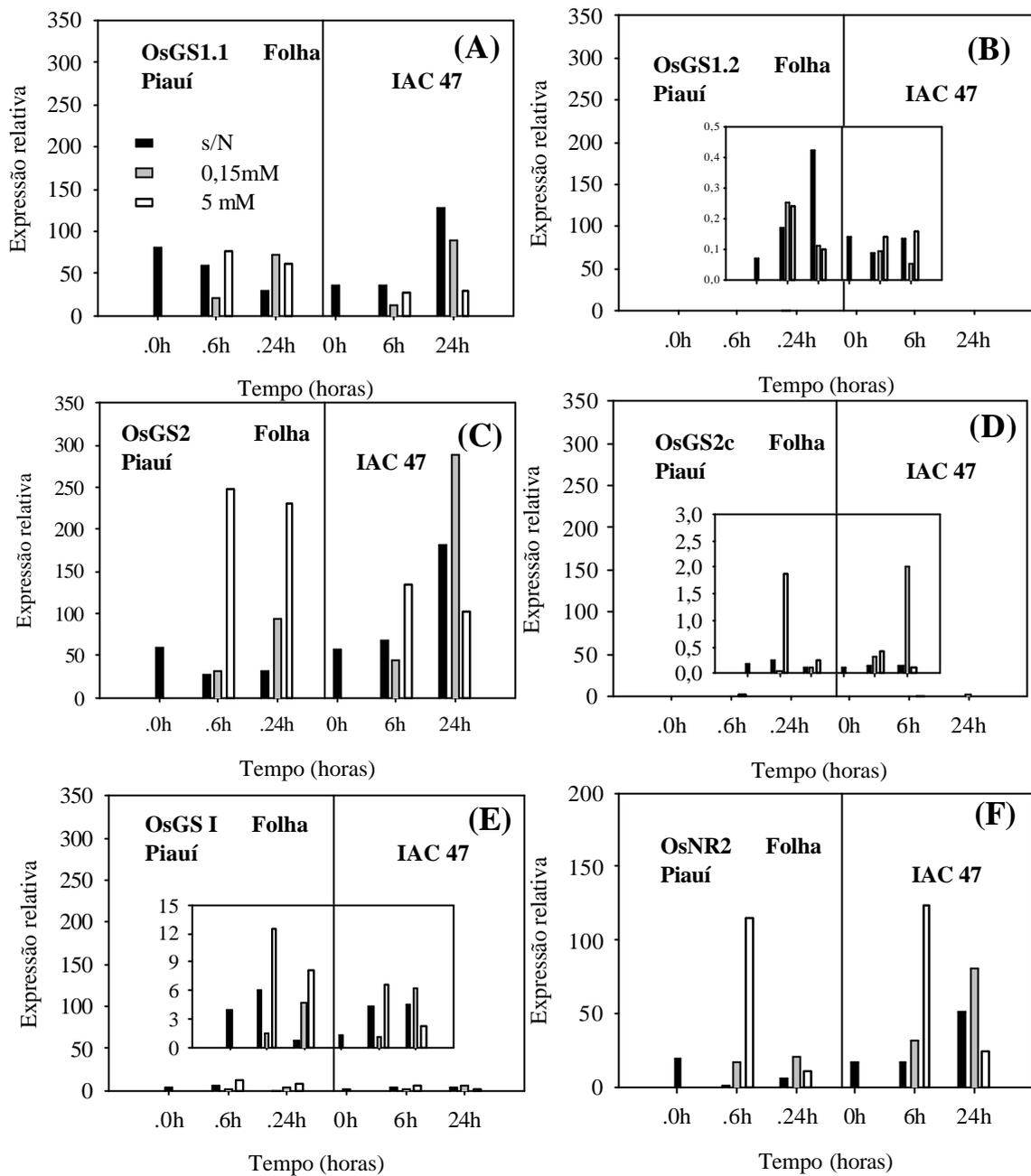


Figura 14. Expressão relativa de genes que codificam para as enzimas Glutamina Sintetase: OsGS1.1 (A), OsGS1.2 (B), OsGS2 (C), OsGS2c (D) e OsGS I (E) e Nitrito Redutase: OsNR2 (F) em folhas de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC 47, sob diferentes níveis de nitrato (sem nitrogênio, 0,15 mM e 5 mM de NO_3^-). A expressão do RNAm de actina foi usado para normalizar as amostras.

5. CONCLUSÕES

Sob alta dose de NO_3^- (5 mM), a OsGS2 foi a principal isoforma de GS envolvida na assimilação de N e síntese de aminoácidos nas raízes e folhas de arroz, podendo ser indicada como enzima responsável pelo controle do metabolismo de N nas condições do experimento.

A variedade Piauí manteve altos teores de N-amino nas folhas, o que parece ter contribuído para a menor expressão do gene que codifica para a nitrato redutase, resultando em acúmulo de nitrato nas folhas. O que confirma a estratégia desenvolvida por essa variedade de arroz de acumular NO_3^- na fase inicial de crescimento para posteriormente remobilizá-lo durante o enchimento dos grãos.

Não houve diferenças significativas na atividade da GS entre variedades, independente da concentração de nitrato na solução, no entanto, existem diferenças na expressão das isoformas da GS entre a variedade tradicional (Piauí) e a melhorada (IAC 47). Isto indica a necessidade de compreendermos melhor os processos bioquímicos e fisiológicos relacionados a eficiência do uso de N e conhecer o papel das enzimas envolvidas na absorção e no acúmulo de N no estágio vegetativo e na remobilização do N para os grãos durante a senescência.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BACHEM, C. W. B.; VAND DER HOEVEN, R. S.; DE BRUIJN, S. M.; VREUGDENHIL, D.; ZABEAU, M. & VISSER, R. G. F. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. **The Plant Journal**, v.9, n.5, p.745-753, 1996.
- BECKER, T. W.; CARRAYOL, E. & HIREL, B. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase isoforms in maize leaves: localization, relative proportion and their role in ammonium assimilation or nitrogen transport. **Planta**, v. 211, 800-806. 2000.
- CALLACI, J; SMARRELLI, J.J. Regulation of the inducible nitrate reductase isoform form soybeans. **Biochim. Biophys. Acta**. vol.1088, p 127-130, 1991.
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E. & YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.853-855, 1975.
- CHEE, M.; YANG, R.; HUBBELL, E.; BERNO, A.; HUANG, X.C.; STERNO, D.; WINKLER, J.; LOCKHART, D.J.; MORRIS, M.S. & FODOR, S.P. Accessing genetic information with high-density DNA arrays. **Science**, v.274, p.610-614, 1996.
- COOKSON, S. J.; WILLIAMS, L. E. AND MILLER, A. J. Light-dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in Arabidopsis leaf cells. **Plant Physiology**. V. 138, 1097-1107. 2005.
- CRAWFORD, N. M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, v. 7, p. 859-868, 1995.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDOLOV, E.D. & SIBERT, P.D. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. **Proc Nat Acad Sci Unit Stat America**, v.93, p.6025-6030, 1996.
- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. ed. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Chichester: John Wiley, 1980. p.265-314.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction. **Anal.Chem**, v. 49, p. 1080-1080, 1977.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, v.34, p.9-18, 1984.
- FERNANDES, M. S.; & ROSSIELLO, R. O. P. Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, n.2, p.111-148, 1995.
- FERNANDES, M.S. Efeitos de fontes e níveis de nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.2, n. 1, p. 1-6, 1990.
- FERNANDES, M.S. N-carriers, light and temperature influences on the free amino-acid pool composition of rice plants. **TURRIALBA**, v. 33, n. 3, p. 297-301, 1983.

- FERRAZ, A.S.D.; SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Nitrogen use efficiency for grain and protein production by rice genotypes. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 435-442, 1997.
- FUENTES, S.I; ALLEN, D.J; ORTIZ-LOPEZ, A.; HERNANDEZ, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, n. 52 v. 358, p. 1071-1081, 2001.
- GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, v. 30, p. 655: 295, 2004.
- HABASH, D. Z.; MASSIAH, A. J.; RONG, H. L.; WALLSGROVE, R. M. AND LEIGH, R. A. the role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. **Annals of Applied Biology**, v. 138, p. 83-89, 2001.
- HARRISON, J.; HIREL, B.; LIMAMI, A.M. Variation in nitrate uptake and assimilation between two ecotypes of *Lotus japonicus* and their recombinant inbred lines. **Physiologia Plantarum**, n.120, p. 124–131, 2004.
- HARRISON, J.; HIREL, B.; AND LIMAMI, A. M. Variation in nitrate uptake and assimilation between two ecotypes of *Lotus japonicus* and their recombinant inbred lines **Physiologia Plantarum**, v. 120, p. 124–131, 2004
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M. & GALLAIS, A. Towards a Better Understanding of the Genetic and Physiological Basis for Nitrogen Use Efficiency in Maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1258-1270, 2001.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Berkeley, California, 347p., 1950.
- IRELAND, R.L.; LEA, P.J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagines, and aspartate metabolism. IN: SING, B.K., ed. **Plant Amino Acid: Biochemistry and Biotechnology**. NEW YORK: MARCEL DEKKER, p. 49-109, 1999.
- ISHIYAMA K, INOUE E, TABUCHI M, YAMAYA T, TAKAHASHI H. Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 11, p. 1640-1647, 2004.
- IZAWA, T. & SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. **Trends in Plant Science**, v.1, n.2, p.95-99, 1996.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate Reductase Assay in intact Plant Tissues. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- KLEIN, D.; MORCUENDE, R.; STITT, M.; KRAPP, A. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, p. 863-871, 2000.
- KRAPP, A.; FRAISIER, V.; SCHEIBLE, W. R.; QUESADA, A.; GOJON, A.; STITT, M.; CABOCHE, M.; DANIEL-VEDELE, F. Expression studies of NRT2:1Np, a putative nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. **The Plant Journal**. 14,723-731,1998.
- LIANG, P. & PARDEE, A. B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, v.257, p.967-971, 1992.
- MASCLAUX, C.; VALADIER, M. H.; BRUGIÈRE, N.; MOROT-GAUDRY, J. F. & HIREL, B. Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. **Planta**, v.211, p.510-518, 2000.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; VALADIER, M-H; CARRAYOL, E.; REISDORF-CREN, M.; HIREL, B. Diurnal changes in the expression of glutamate dehydrogenase and nitrate reductase are involved in the C/N balance of tobacco source leaves. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, p. 1451-1462, 2002.

OBARA, M.; KAJIURA, M.; FUKUTA, Y.; YANO, M.; HAYASHI, M.; YAMAYA, T.; SATO, T. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthetase in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 359, p. 1209-1217, 2001.

OLIVEIRA, I.C.; CORUZZI, G.M. Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in Arabidopsis. **Plant Physiology**, n. 121, v. 1, p. 301-309, 1999.

ORSEL, M.; FILLEUR, S.; FRAISIER, V. & DANIEL-VEDELE, F. Nitrate transport in plants: which gene and which control? **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.825-833, 2002.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T. & MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1023-1031, 2003.

RODRIGUES, F. S.; SOUZA, S. R.; RODRIGUES, F. S.; FERNANDES, M. S. Nitrogen metabolism in rice cultivated under seasonal flush of nitrate. **Journal of Plant Nutrition** v.27, n.3, p.395-409, 2004.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 3^a Ed. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001. v. 2, p. 8.86 – 8.94.

SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; AND VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1851-1864, 2003.

SANTOS, L. A. **Absorção e remobilização de NO₃⁻ em arroz (*Oryza sativa* L.): atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo**. 2006. 88 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do Solo) Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2006.

SANTOS, C.; PEREIRA, A.; PEREIRA, S.; TEIXEIRA, J. Regulation of glutamine synthetase in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. **Scientia Horticulturae**, n.103, p. 101-111, 2004.

SATO, H.; DOMON, E.; KAWASE, M.; HASEGAWA, H.; IDA, S.; YATOU, O.; ICHII, M. Reduced level of NADH-dependent nitrate reductase activity in rice mutant M819 due to deletion of a valine residue in heme domain. **Breeding Sci.** n. 47: p. 115-120. 1997.

SHEIBLE, W.; GONZÁLEZ-FONTES, A.; LAUERE, M.; MÜLLER-RÖBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell**, v. 9, p. 783-798, 1997.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings. **Plant Physiology**, n. 114, v. 2, p. 583-589, 1997.

- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M. & FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v.21, n.10, p.2049-2063, 1998.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M.L.; MAGALHÃES, J. R. & FERNANDES, M. S. Supplemental nitrogen applied during de senescence on two rice varieties: evaluation of nitrate reductase and glutamine synthetase activities and crude protein. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v. 8, n. 1, p. 87-95, 2002.
- SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant nutrition**, n. 21, p. 10, p. 2049-2063, 1998.
- SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S.; MAGALHÃES, J.R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars, and crude protein of rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, n. 30, v. 5-6, p. 711-724, 1999.
- SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M; FERNANDES. M.S. Effects of supplemental-nitrogen on the quality of rice proteins. **Journal of Plant Nutrition**, n. 16, v. 9, p. 1739-1751, 1993.
- TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H. AND YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1.1, a cytosolic glutamine synthetase. **The Plant Journal**, v. 42, p. 641-651, 2005.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment**, v.23, p.1005-1024, 2000.
- VELCULESCU, V.E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B & KINZLER, K.W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v.5235, p.484-487, 1995.
- WANG, A. M.; DOYLE, M.V.; MARK, D.F. Quantification of RNAm by the polymerase chain reaction. . **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p 9717-9721, 1989.
- WANG, H.; GARVIN, D. F. & KOCHIAN, L. V. Nitrate-Induced Genes in Tomato Roots. Array Analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v.127, p.345-359, 2001.
- WANG, R.; GUEGLER, K.; LABRIE, S.T.; CRAWFORD, N.M. Genomic Analysis of a Nutrient Response in Arabidopsis Reveals Diverse Expression Patterns and Novel Metabolic and Potential Regulatory Genes Induced by Nitrate. **The Plant Cell**, v. 12, p. 1491-1509, 2000.
- WELSH, J.; CHADA, K.; DALAL, S. S.; CHENG, R. & MCCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, v.20, n.9, p.4965-4970, 1992.
- WETSELAAR, R. Nitrate distribution in tropical soils. II. Extent of capillary accumulation of nitrate during a long dry period. **Plant and Soil**, v.15, p.121-133, 1961b.
- WILLIAMS, L.E. & MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.659-688, 2001.
- YAMAYA, T., HAYAKAWA, T., TANASAWA, K., KAMACHI, K., MAE, T. AND OJIMA, K. Tissue distribution of glutamate synthase and glutamine synthetase in rice leaves.

Occurrence of NADHdependent glutamate synthase protein and activity in the unexpanded non-green leaf blades. **Plant Physiol.** 100, 1427–1432. 1992.

YEMM, E.W. & COCKING, E.C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Anal. Biochem.**, v.80, p.209-213, 1955.

YEMM, E.W. & WILLIS, A.I. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J.**, v.57, p.508-514, 1957.

ZHONGCHUN, J.; HULL, R.J. Interactions of nitrate uptake, nitrate reductase, and nitrogen use efficiency in selected Kentucky bluegrass cultivars. **Crop Science**, v.38, n 6, p. 1623-1632, 1998.

ZHUO, D.; OKAMOTO, M.; VIDMAR, J.J. & GLASS, A.D. M. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (Nrt2;1At) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.17, n.5, p.563-568, 1999.