

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE AGRONOMIA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CIÊNCIA DO SOLO**

**DISSERTAÇÃO**

**Expressão Gênica de Transportadores de Nitrato e  
Amônio, Proteína Reguladora NAR e Bombas de  
Prótons em Arroz (*Oryza sativa* L.) e seus Efeitos na  
Eficiência de Absorção de Nitrogênio**

**Marcus Vinícius Loss Sperandio**

**2011**



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

**EXPRESSÃO GÊNICA DE TRANSPORTADORES DE NITRATO E  
AMÔNIO, PROTEÍNA REGULADORA NAR E BOMBAS DE PRÓTONS  
EM ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.) E SEUS EFEITOS NA EFICIÊNCIA  
DE ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO**

**MARCUS VINÍCIUS LOSS SPERANDIO**

*Sob a Orientação da Professora*

**Sonia Regina de Souza**

*e Co-orientação do Professor*

**Leandro Azevedo Santos**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2011

633.18  
S749e  
T

Sperandio, Marcus Vinícius Loss, 1986-  
Expressão gênica de transportadores de nitrato e amônio, proteína reguladora NAR e bombas de prótons em arroz (*Oryza Sativa* L.) e seus efeitos na eficiência de absorção de nitrogênio / Marcus Vinícius Loss Sperandio - 2011.  
69 f.: il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia.

Bibliografia: f. 45-53.

1. Arroz – Teses. 2. Arroz - Nutrição – Teses. 3. Plantas – Efeito do nitrogênio - Brasil - Teses. 4. Nitrogênio na agricultura – Teses. I. Souza, Sonia Regina, 1962-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em 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**

**MARCUS VINÍCIUS LOSS SPERANDIO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências** em Agronomia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2011

---

Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ  
Orientadora

---

Luiz Mors Cabral. Dr. UFF

---

Marcelo de Freitas Lima. Dr. UFRRJ

## **DEDICATÓRIA**

A Deus que sempre me iluminou e deu forças em todos os momentos da minha vida para que alcançasse os objetivos.

Aos meus queridos pais José Salvador Sperandio e Marilza da Penha Loss Sperandio que sempre estiveram ao meu lado e apoio incondicional.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Antes de todos os outros e acima de tudo, Deus que esteve sempre presente e colocou sua mão no meu ombro em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais José Salvador Sperandio e Marilza da Penha Loss Sperandio e minha irmã Sâmia Marize Loss Sperandio que são meu maior presente nessa terra.

Ao meu motek, Marcela Jacques, por todo o carinho, amor e atenção durante todos os momentos.

À professora Sonia Regina de Souza pelo “resgate”, pela oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa e carinho e atenção desde a minha Iniciação Científica.

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes por tantos anos de convivência e ensinando o que é fazer pesquisa.

Aos doutores Leandro Azevedo Santos e Carlos Alberto Bucher pelos ensinamentos de laboratório e por ter me apresentando ao mundo das bombas de prótons e biologia molecular.

Aos meus eternos amigos Bruno Mathias de Oliveira e Osmário José Lima de Araújo que foram como meus irmãos.

Aos bolsistas de IC/amigos Renan Pinto Braga, Leandro Martins Ferreira e Rafael Passos Rangel por todos os auxílios nas coletas e análises.

À doutoranda Natália Pereira Zatorre pela primeira oportunidade de trabalho no meio científico.

Às minhas amigas Rafaela de Almeida Alves e Cassia Pereira Coelho pela convivência e amizade.

Ao professor André Marques dos Santos e Victor Hugo Criado Berbert pelos primeiros trabalhos no laboratório de nutrição de plantas.

Ao CPGA-CS, em especial ao Marquinhos, Roberto, Luciene e professor Marcos Gervasio por toda atenção.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro desde a Iniciação Científica.

A todos que de alguma forma ajudaram a elaborar este trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Marcus Vinícius Loss Sperandio nasceu em 13 de fevereiro de 1986 na cidade de Aimorés (MG). Fez o ensino fundamental na escola Benevenuto Clementino Gobbo e ensino médio/profissionalizante na Escola Agrotécnica Federal de Colatina (ES). Em 2004 ingressou no curso de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde foi bolsista CNPq por três anos trabalhando no Laboratório de Nutrição de Plantas. Ganhou prêmios de Iniciação Científica em 2007 e 2008 pelos trabalhos com expressão de genes relacionados à absorção de nitrogênio. Em 2008 foi aprovado para o mestrado nos cursos de Pós-Graduação da ESALQ/USP, UFV, UFLA, UFRRJ (Fitotecnia) e UFRRJ (Ciência do Solo). Em março de 2009 ingressou no mestrado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo na UFRRJ, desenvolvendo trabalhos relacionados à absorção de nitrato e amônio.

## ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Sequências dos primers usados nas reações de PCR em tempo real para os dez genes das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases (*OsA1* a *Os10*), três isoformas de transportadores de nitrato (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e amônio (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*), actina (*OsAct11*) de arroz, números de íntrons e éxons e acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI..... 12
- Tabela 2.** . Peso fresco das plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas durante dezoito dias em câmara de crescimento em solução contendo 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou 2,0 mM de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de modo constante, com ressuprimento de 2 mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou 2 mM de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> após 72 horas de deficiência ou com deficiência de N durante 75 horas. .... 20
- Tabela 3.** Peso fresco das plantas de arroz da variedade Piauí e IAC-47 cultivadas durante dezenove dias em câmara de crescimento em solução contendo 2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de modo constante, com ressuprimento 0,2 ou 5 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou após 72 horas de deficiência e com deficiência de N durante 96 horas. .... 29
- Tabela 4.** Correlação linear (Coeficiente de Pearson) entre *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*, *OsNAR2.1*, *OsA2* e *OsA7* nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí..... 43
- Tabela Anexo 1.** Número de Expressed Sequence Tags (EST) das PM H<sup>+</sup>-ATPases em arroz baseado na busca nos bancos de dados de arroz (TIGR - <http://rice.plantbiology.msu.edu>) (YUAN et al., 2005). .... 54

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Modelo do experimento I usando a variedade de arroz Nipponbare para estudo da expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase, quando sob cultivo constante em 2 mM de nitrato ou amônio, deficiência de N e deficiência de N seguida de ressuprimento com 2 mM de nitrato ou amônio. Foram feitos dois diferentes experimentos: um com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e outro com N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de N. ....10
- Figura 2.** Modelo do experimento II usando as variedades de arroz IAC-47 e Piauí para estudo da expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase e transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. ....14
- Figura 3.** Expressão relativa das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases nas raízes (a e c) e parte aérea (b e d) de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (A e B) ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (c e d) com suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O tratamento controle (2 mM constante com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foi assumido como tratamento de referência com valor igual a 1. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições. O gene da actina (*OsAct11*) foi usando como referência. ....16
- Figura 4.** Taxa de absorção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> da solução nutritiva em plantas de arroz da variedade Nipponbare três horas após o início dos tratamentos, em experimentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições. ....18
- Figura 5.** Atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases na parte aérea e raiz de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (a) ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (b) submetidas a suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições. ....19
- Figura 6.** Teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (a e d), N-amino livre (b e e) e N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (c) (as plantas cultivadas com N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> não apresentaram N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em tecido) nas plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (a, b e c) ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (d e e) sob suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições. ....21
- Figura 7.** Teores de açúcares solúveis nas plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (a) ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (b) sob suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições. ....22

- Figura 8.** Expressão relativa de três transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e três transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) em raízes (a e c) e parte aérea (b e d) de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com  $\text{NO}_3^-$  (a e b) ou  $\text{NH}_4^+$  (c e d) sob suprimento constante de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  ou deficiência por 75 horas de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . O tratamento controle (2 mM constante com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) foi assumido como tratamento de referência. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N- $\text{NO}_3^-$  ou N- $\text{NH}_4^+$  (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam médias  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....24
- Figura 9.** Influxo aparente de  $\text{NO}_3^-$  nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí sob ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....26
- Figura 10.** Atividade da Nitrato Redutase (ANR) em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....27
- Figura 11.** Teores de N- $\text{NO}_3^-$  em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....28
- Figura 12.** Expressão das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases da PM  $\text{H}^+$ -ATPase *OsA2* e *OsA7* em plantas de arroz das variedades IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....31
- Figura 13.** Atividade da PM  $\text{H}^+$ -ATPase em plantas de arroz das variedades IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....32
- Figura 14.** Expressão dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e proteína NAR *OsNAR2.1* em plantas de arroz das variedades IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....34
- Figura 15.** Teores de N- $\text{NH}_4^+$  em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. ....37
- Figura 16.** Teores de N-amino livre em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas

após o fornecimento de $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média $\pm$ SE (erro padrão) de três repetições. ....	<b>38</b>
<b>Figura 17.</b> Teores de açúcares solúveis em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de $\text{NO}_3^-$ (sem N), ressuprimento de $\text{NO}_3^-$ (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média $\pm$ SE (erro padrão) de três repetições. ....	<b>40</b>
<b>Figura 18.</b> Modelo proposto para representar as diferenças de absorção de $\text{NO}_3^-$ entre as variedades de arroz IAC-47 e Piauí. <i>mRNA</i> * representa a expressão dos genes avaliados por PCR em tempo real no experimento II ( <i>OsNRT2.1</i> , <i>OsNRT2.2</i> , <i>OsNAR2.1</i> , <i>OsA2</i> e <i>OsA7</i> ) e MP membrana plasmática. ....	<b>42</b>

## LISTA DE SÍMBOLOS

AHA	Arabidopsis H <sup>+</sup> -ATPase
ANR	Atividade da Nitrato Redutase
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumine)
BTP	1,3-Bis[Tris(hydroxymethyl)methylamino]propane
DAG	Dias Após a Germinação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilglicol tetracético
Fd	Ferredoxina
H <sup>+</sup> -PPase	Pirofosfatase translocadora de prótons
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesufonic acid) hemisodium salt
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (Low Affinity Transport System)
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico
NRT1	Família de genes para os transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> de baixa afinidade
NRT2	Família de genes para os transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> de alta afinidade
OsA	<i>Oryza sativa</i> H <sup>+</sup> -ATPase
PMA	H <sup>+</sup> -ATPase de <i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
PM H <sup>+</sup> -ATPase	H <sup>+</sup> -ATPase de plasmalema
PMSF	Polimetilssulfonil fluoreto
PPi	Pirofosfato
PVP	Polivinilpirrolidona
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
V-H <sup>+</sup> -ATPase	H <sup>+</sup> -ATPase de vacúolo

## RESUMO

SPERANDIO, Marcus Vinícius Loss. **Expressão gênica de transportadores de nitrato e amônio, proteínas reguladoras NAR e bombas de prótons em arroz (*Oryza sativa* L.) e seus efeitos na eficiência de absorção de nitrogênio.** 2011. 54 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2011.

Neste trabalho a principal meta foi avaliar a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) de plantas para uma agricultura de baixos insumos, um passo fundamental no desenvolvimento da agricultura tropical. O objetivo foi avaliar os efeitos de deficiência e ressuprimento de nitrogênio na expressão de dez isoformas PM H<sup>+</sup>-ATPases em arroz e dos transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Dois experimentos foram feitos: um com a variedade Nipponbare para avaliar a expressão das PM H<sup>+</sup>-ATPases e outro com as variedades IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional) para estudar os efeitos das PM H<sup>+</sup>-ATPases em variedades contrastantes no uso de N, assim como transportadores de nitrato. A absorção aparente de ambas as formas de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi maior com seu ressuprimento. O ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> após três dias de deficiência de N resultou na indução das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases *OsA1*, *OsA2*, *OsA5* e *OsA7* na parte aérea e *OsA2*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* nas raízes. O ressuprimento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> resultou na indução das isoformas *OsA1*, *OsA3* e *OsA7* nas raízes, enquanto *OsA1* foi induzida na parte aérea. O aumento observado na absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> resultou em maior atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases. Nas raízes, os transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* foram induzidos pelo ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, enquanto os transportadores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* foram induzidos pela deficiência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os resultados mostram que a expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases está relacionada aos transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e em qual parte da planta é considerada. O conhecimento da interação entre transportadores de N e expressão de isoformas específicas de PM H<sup>+</sup>-ATPases é relevante para o entendimento da eficiência de absorção de N em plantas. As isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases *OsA2* e *OsA7* por terem sido as mais induzidas com o ressuprimento de N podem ser consideradas como genes candidatos a afetar a eficiência de absorção de N em arroz. No segundo experimento conduzido com as variedades de arroz IAC-47 (melhorada) e Piauí (local) mostrou que essas duas variedades diferem quanto ao uso de N. A variedade Piauí apresentou maiores teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-amino livre e menores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Ainda, essa variedade apresentou maior atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase no tempo de 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, assim como maior expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase *OsA2* e *OsA7*. A variedade Piauí apresentou maior influxo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no ressuprimento (0,2 e 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), assim como maior expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* nesses tratamentos. Esses resultados sugerem que a maior absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> com o ressuprimento na variedade Piauí pode estar relacionada à maior expressão de genes que codificam para transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e PM H<sup>+</sup>-ATPases.

**Palavras-chave:** PM H<sup>+</sup>-ATPase. Nutrição mineral. PCR em tempo real.

## ABSTRACT

SPERANDIO, Marcus Vinícius Loss. **Expression of nitrate and ammonium transporters, NAR protein regulator and proton pumps in rice (*Oryza sativa* L.), and the effect on nitrogen uptake efficiency.** 2011. 54p. Dissertation (Master Science in Agromomy - Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2011.

The main goal of this study was to evaluate the nitrogen usage efficiency (NUE) of plants for a low input agriculture, as a fundamental step for tropical agriculture development. The objective was to evaluate the effect of N deficiency and resupply on expression of ten PM H<sup>+</sup>-ATPase isoforms, and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in rice. Two experiments were set, one with the Nipponbare variety, to evaluate expression of PM H<sup>+</sup>-ATPase; and the other with IAC47 (improved) and Piauí (traditional) varieties, to study how PM H<sup>+</sup>-ATPase and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters behaved in varieties with contrasting N-use efficiency. The NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake were highest under N-resupply. The NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N resupply after 3 days of N-deficiency resulted in induction of *OsA1*, *OsA2*, *OsA5* and *OsA7* PM-H<sup>+</sup>-ATPases in the shoot, and of *OsA2*, *OsA5*, *OsA7* and *OsA8* in the roots. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N resupply resulted in induction of the *OsA1*, *OsA3*, and *OsA7* isoforms in roots and *OsA1* in the shoots. A correlation was observed between nitrate and ammonium uptake, and an increase in the PM H<sup>+</sup>-ATPases. In the roots, the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters *OsNRT2.1* and *OsNRT2.2* had higher induction under NO<sub>3</sub><sup>-</sup> resupply, while the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter *OsAMT1.1* and *OsAMT1.2* were induced by NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N starvation. These results showed that the expression of PM H<sup>+</sup>-ATPases isoforms is related to both NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters and in which plant part it takes place. The knowledge of the interaction between N-transporters and PM H<sup>+</sup>-ATPases specific isoforms is important for understanding NUE in plants. Two H<sup>+</sup>-ATPases isoforms *OsA2* e *OsA7* that were most induced under N-resupply can be thought as the most probable genes to affect N-uptake efficiency in rice. The second experiment showed that the varieties IAC-47 and Piauí differ widely about the N usage. The Piauí variety showed the highest level of nitrate and free Amino-N, and the lowest levels of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Also, this variety had the highest PM H<sup>+</sup>-ATPase activity 24 hs after resupply with 0.2 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, as well as the highest expression of the PM H<sup>+</sup>-ATPase *OsA2* and *OsA7*. The Piauí variety showed the highest nitrate influx under N-resupply (0.2 and 5.0 mM NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) as well as higher expression of *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* and *OsNAR2.1* under those treatments. These results suggest that the highest NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake of Piauí variety under N-resupply may be related to the highest expression of genes that code for nitrate transporters and PM H<sup>+</sup>-ATPases.

**Keywords:** PM H<sup>+</sup>-ATPase. Mineral nutrition. Real time PCR.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Transportadores de Nitrato (NRT) e Transportadores de Amônio (AMT) .....	3
2.2. A H <sup>+</sup> -ATPase de Membrana Plasmática (PM H <sup>+</sup> -ATPase, EC 3.6.3.6).....	6
2.3. Relação entre a Absorção de Nutrientes e a PM H <sup>+</sup> -ATPase .....	8
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
3.1. Expressão das Isoformas de PM H <sup>+</sup> -ATPase e Transportadores de nitrato e amônio em Resposta a Deficiência e Ressuprimento de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> em Plantas de Arroz da Variedade Nipponbare - Experimento I .....	10
3.1.1 Cultivo e condução do experimento das plantas de arroz variedade Nipponbare usando N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ou N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	10
3.1.2. Avaliação da expressão gênica da PM H <sup>+</sup> -ATPase ( <i>Osa1</i> a <i>OsA10</i> ) e transportadores de nitrato ( <i>OsNRT1.1</i> , <i>OsNRT2.1</i> e <i>OsNRT2.2</i> ) e amônio ( <i>OsAMT1.1</i> , <i>OsAMT1.2</i> e <i>OsAMT1.3</i> ).....	11
3.1.3 Análises de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N-amino livre e açúcares solúveis em tecido vegetal	12
3.1.4 Determinação da absorção de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	12
3.1.5 Avaliação da atividade das PM H <sup>+</sup> -ATPases.....	12
3.2. Efeito do Ressuprimento e Deficiência de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sobre a Expressão e Atividade da PM H <sup>+</sup> -ATPase, Transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e Proteínas NAR nas Variedades de Arroz Piauí e IAC-47 - Experimento II. ....	13
3.2.1 Cultivo e condução do experimento das plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí usando N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	13
3.2.2. Avaliação da expressão gênica das PM H <sup>+</sup> -ATPases ( <i>Osa2</i> e <i>OsA7</i> ) e transportadores de nitrato ( <i>OsNRT2.1</i> e <i>OsNRT2.2</i> ) e proteínas NAR ( <i>OsNAR2.1</i> ).....	14
3.2.3 Análise de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , N-amino livre; absorção de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ; atividade da PM H <sup>+</sup> -ATPase e atividade da Nitrato redutase .....	14
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>15</b>
4.1 Expressão das Isoformas de PM H <sup>+</sup> -ATPases e Transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> em Resposta a Deficiência e Ressuprimento de N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> em Plantas de Arroz da Variedade Nipponbare - Experimento I.....	15
4.2. Efeito do Ressuprimento e Deficiência de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> sobre a Expressão e Atividade da PM H <sup>+</sup> -ATPase, Transportadores de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> e Proteínas NAR em Raízes das Variedades de Arroz Piauí e IAC-47 - Experimento II. ....	25
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>7. ANEXO.....</b>	<b>54</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais utilizados na alimentação humana em diversas partes do mundo, principalmente pela poluição de baixa renda. A produção no Brasil na safra 2010/2011 foi de 12.628,2 mil toneladas em uma área plantada de 2.746,7 mil hectares (CONAB 2011). Arroz é uma planta estratégica para estudos de absorção de N por ter seu genoma seqüenciado, sendo uma planta modelo entre as monocotiledôneas para estudos moleculares e pela importância sócio-econômica (ARAKI & HASEGAWA, 2006; DUAN et al., 2007).

O nitrogênio (N) é um nutriente requerido em grandes quantidades pelas plantas, no entanto, sua disponibilidade é reduzida por ser facilmente perdido por lixiviação, volatilização para a atmosfera ou desnitrificação por microrganismos (ZHAN & FORDE, 2000). Isso leva o N a estar em baixas concentrações no solo, levando a aplicações sucessivas de fertilizantes nitrogenados ano após ano (GLASS, 2003).

Para suprir a necessidade de N nos cultivos ao redor do mundo são gastos aproximadamente  $80 \times 10^{12}$  g de N anualmente (MILLER e CRAMER, 2004), sendo que somente 30 – 40% do N aplicado são absorvidos pelas plantas. Contudo, a dependência de energia fóssil para a fabricação de fertilizantes tem onerado os custos de aplicação. Em 2007/2008 foram aplicados aproximadamente 128 milhões de toneladas de adubos nitrogenados, sendo 65% na produção de cereais (GARNETT et al., 2009). Os custos e a perda de N do solo levam à busca dos mecanismos da eficiência de absorção e uso de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  pelas plantas.

Diversos estudos têm abordado características fisiológicas e moleculares relevantes para a eficiência de absorção de N. Tem sido relatado que os transportadores de nitrato e os transportadores de amônio de alta afinidade são um dos principais fatores envolvidos na eficiência de absorção de N da solução do solo (ARAKI & HASEGAWA, 2006; SONODA et al., 2003). A  $\text{H}^+$ -ATPase de plasmalema (PM) também foi revelada ser um elemento chave na absorção de N, além de outros nutrientes, por energizar o transporte através da criação de um gradiente de  $\text{H}^+$  entre o apoplasto e o citossol (GLASS et al., 2003; SONDERGAARD et al., 2004).

O genótipo e o ambiente influenciam a eficiência de absorção de N do solo, onde as características fisiológicas e moleculares estão em associação direta com clima, solo e manejo (SAMBROSKI et al., 2008). Nesse aspecto, plantas que foram selecionadas em ambientes com baixa disponibilidade de nutrientes apresentariam adaptações que lhes permitiriam absorver nutrientes da solução do solo em baixas concentrações. Análises de expressão gênica em larga escala (*Microarray, microarranjo*) indicam que plantas sob baixa disponibilidade de N aumentam a expressão de fatores de transcrição envolvidos na regulação de genes do metabolismo de C e N, mostrando a importância da regulação transcricional das plantas para sobreviver em baixa disponibilidade de N (LIAN et al., 2006). A adaptação de plantas de *Arabidopsis* sob baixa disponibilidade de N está relacionada com a capacidade de acumular nitrato nos vacúolos mantendo baixa atividade da enzima nitrato redutase, regulada a nível transcricional e pós-traducional (NORTH et al., 2009).

Foi demonstrado que plantas mais eficientes no uso de N possuem maior absorção de  $\text{NO}_3^-$  na fase vegetativa, que posteriormente pode ser remobilizado para outras partes da planta (HIREL et al., 2001). A maior eficiência de absorção de N pode estar relacionada com a maior expressão dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$ , assim como maior atividade da PM  $\text{H}^+$ -ATPase necessária para a criação do gradiente de  $\text{H}^+$  entre o citossol e o apoplasto. Em trigo (*Triticum aestivum*), 60-95% do N armazenado no grão é proveniente da remobilização do N

estocado nas raízes e parte aérea (HIREL et al., 2007), mostrando a importância da absorção de N na fase vegetativa.

A princípio, há duas maneiras de favorecer a absorção de nutrientes pela planta: a primeira seria a elevação das concentrações externas através da prática da adubação; a segunda é tornando o potencial de membrana mais negativo para os cátions ou aumentando o gradiente de  $H^+$  ( $\Delta\mu H^+$ ) para os ânions. Esta última envolve diretamente a participação das PM  $H^+$ -ATPases. Assim, é de interesse da nutrição de plantas identificar quais isoformas de PM  $H^+$ -ATPases estão relacionadas com a absorção de nutrientes como  $NO_3^-$  e  $NH_4^+$ .

Apesar da arquitetura da raiz ser uma importante característica para sobrevivência das plantas, deve-se também selecionar plantas com raízes adaptadas para condições apropriadas de crescimento (HERDER et al., 2010). Os mecanismos regulatórios da aquisição de N do solo necessitam estar coordenados com o ambiente para garantir a maior absorção de N, como por exemplo, detectar o nível de N e transmitir essa informação para expressão de genes relacionados com a absorção de N em baixa ou em alta concentração (KRAISER et al., 2011).

As variedades de arroz IAC-47 (melhorada) e Piauí (local) foram anteriormente avaliadas quanto à eficiência de uso de N. A variedade Piauí apresentou maior remobilização de N para o grão e maior teor de proteína bruta no grão (SOUZA et al., 1998). Quando IAC-47 e Piauí foram cultivadas durante 28 dias em solução de Hoagland modificada com 2 mM de  $N-NO_3^-$  e submetidas à deficiência de N, a variedade Piauí acumulou mais nitrato nas raízes e bainha, e durante a deficiência de  $NO_3^-$  mostrou-se mais adaptada à ambientes pobres em nutrientes (SANTOS et al., 2009). A variedade Piauí apresentou maior expressão de *OsGln2* (Glutamina Sintetase plastidial) quando cultivada sob baixo suprimento de  $NO_3^-$  (BUCHER, 2007). A maior atividade de Glutamina Sintetase (GS) contribui para o melhor desenvolvimento em condições de baixo suprimento de N (YI-BO et al., 2010).

A variedade Piauí apresentou menor  $K_M$  e maior  $V_{max}$  com ressurgimento de 0,2 mM de  $N-NO_3^-$  em relação à variedade IAC-47, indicando que sob baixa disponibilidade de  $NO_3^-$  a variedade Piauí apresenta maior afinidade pelo  $NO_3^-$  e maior velocidade de absorção (SANTOS et al., 2011). Isto pode ser reflexo de mais sítios de absorção de  $NO_3^-$  na variedade Piauí, visto que o influxo de  $NO_3^-$  está relacionado positivamente com o acúmulo de transcritos de *NRT2.1* (principal transportador envolvido na absorção de  $NO_3^-$ ) (LI et al., 2007).

Dessa forma, a hipótese científica deste trabalho é que a absorção do  $NO_3^-$  disponível no meio pode estar relacionada com a maior eficiência do sistema de transporte, composto pelos transportadores de nitrato e bombas de prótons. Os estudos de expressão gênica irão elucidar como duas variedades de arroz contrastantes quanto à eficiência de uso de nitrogênio se comportam na presença do  $NO_3^-$ .

Este trabalho teve por objetivo estudar entre as isoformas de PM  $H^+$ -ATPases quais são induzidas pelo ressurgimento de  $NO_3^-$  ou  $NH_4^+$ , identificando genes chave para a absorção de N em arroz. Posteriormente, foi avaliada a eficiência de absorção de nitrato por variedades de arroz contrastantes quando ao uso de N através das isoformas da proteína reguladora *NAR* (*OsNAR2.1*), transportadores de nitrato (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*) e PM  $H^+$ -ATPases, relacionando-os com as frações nitrogenadas (N-amino livre,  $N-NH_4^+$  e  $N-NO_3^-$ ) e açúcares solúveis em condições de disponibilidade diferencial de nitrato.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Transportadores de Nitrato (NRT) e Transportadores de Amônio (AMT)

A absorção de nutrientes pelas células é mediada por proteínas transportadoras específicas localizadas na membrana plasmática. O  $\text{NO}_3^-$  é absorvido por transportadores da família gênica NRT (*Nitrate Transporter*), enquanto para o  $\text{NH}_4^+$  atua a família gênica AMT (*Ammonium Transporter*) (MAATHUIS, 2009). Ambos operam em alta e baixa afinidade, dependendo das concentrações do íon no meio (FERNANDES & SOUZA, 2006). As isoformas *AMT1.1* e *AMT1.2* (alta afinidade) são expressas somente nas raízes (LOQUE et al., 2007), enquanto na família NRT todas as isoformas são expressas nas raízes, sendo *NRT2.1* e *NRT2.2* (alta afinidade) induzidas por  $\text{NO}_3^-$  e as outras isoformas (*OsNRT2.3* e *OsNRT2.4*) constitutivas (ARAKI e HASEGAWA, 2006).

A absorção de  $\text{NO}_3^-$  nas células ocorre através de transportadores presentes na membrana plasmática, que podem ser classificados de acordo com sua afinidade pelo substrato. Há transportadores de alta afinidade (HATS - “High Affinity Transport System”) que operam sob baixas concentrações de  $\text{NO}_3^-$ , podendo ser divididos em constitutivos (cHATS) que operam a concentrações de aproximadamente 0,2 mM e os induzidos (iHATS) que operam a concentrações menores que 0,2 mM. Há ainda os transportadores de baixa afinidade (LATS - “Low Affinity Transport System”) que operam em concentrações acima de 1 mM (SIDDIQI et al., 1990; ASLAM et al., 1992; ASLAM et al., 1993). Os HATS e os LATS são codificados, respectivamente, pelas famílias gênicas NRT2 e NRT1.

O transportador de nitrato *NRT1.1*, também conhecido por *CHL1*, foi caracterizado como um transportador de dupla afinidade (opera tanto em altas concentrações de nitrato quanto baixas concentrações). *NRT1.1* opera em alta afinidade quando o resíduo de aminoácido T101 está fosforilado e em baixa afinidade quando T101 está desfosforilado (LIU & TSAY, 2003). Além do transporte de  $\text{NO}_3^-$ , *NRT1.1* desempenha papel fundamental como sensor da concentração de nitrato no solo. Em baixas concentrações de nitrato, *NRT1.1* com T101 fosforilado interage com CIPK23 (CBL-Interacting Protein Kinase 23) e induz a expressão de genes associados ao metabolismo de nitrato em baixos níveis (HO et al., 2009). Sob altas concentrações de nitrato, *NRT1.1* com T101 desfosforilado interage com CIPK8 e induz genes da absorção e assimilação de nitrato, não afetando a absorção em baixas concentrações (HU et al., 2008).

Recentemente, foi demonstrado que *NRT1.1* também atua na sinalização/emissão de raízes laterais em *Arabidopsis* (KROUK et al., 2010). A deficiência de  $\text{NO}_3^-$  induz o crescimento axial das raízes, enquanto alta dose de  $\text{NO}_3^-$  induz a emissão de raízes laterais. Quando plantas de *Arabidopsis* são crescidas com 0,2 mM de  $\text{NO}_3^-$  ocorre transporte de auxina para a ponta da raiz, enquanto que com 5,0 mM de  $\text{NO}_3^-$  o transporte de auxina ocorre no sentido da raiz lateral através do *NRT1.1*, promovendo o crescimento da raiz nesse sentido (KROUK et al., 2010). Esse estudo foi realizado com plantas mutantes sem a expressão de *NRT1.1* (*chl1-5*), preenchendo a lacuna sob o provável mecanismo de controle de crescimento/arquitetura radicular influenciada pelo  $\text{NO}_3^-$ .

Com o seqüenciamento do genoma de *Arabidopsis* foram encontrados sete prováveis genes que codificam transportadores de alta afinidade de nitrato, e com exceção de *AtNRT2.7*, todos são predominantemente expressos em raízes (WIRTH et al., 2007). Esses genes são expressos com padrões que podem depender do suprimento externo de nitrato (ORSEL et al., 2002; OKAMOTO et al., 2003).

Em arroz são conhecidos quatro transportadores de nitrato de alta afinidade, sendo que duas isoformas possuem a mesma seqüência codante (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*), mas as regiões

não codantes (UTR, “*untranslated region*”, região não traduzida) são diferentes, gerando diferentes padrões de expressão entre os genes (ARAKI & RASEGAWA, 2006).

O acúmulo de transcritos do transportador NRT2.1 ocorre principalmente nas regiões da epiderme e córtex em raízes (NAZOA et al., 2003), sendo fortemente influenciado por mudanças ambientais (MILLER et al., 2007). Análises com plantas de *Arabidopsis* mutantes sem *AtNRT2.1* mostraram deficiência de HATS sob baixa dose de nitrato (0,2 mM), mas quando foram crescidas sob alta dose de nitrato (6,0 mM) não apresentaram sinais de deficiência (ORSEL et al., 2006). A expressão gênica dos HATS também é influenciada pelo status de N. A expressão do transportador *AtNRT2.1* é induzido por nitrato, mas é reprimido por metabólitos gerados pela redução do nitrato, como amônio e aminoácidos (NAZOA et al., 2003). A diferença de expressão entre as isoformas de transportadores de nitrato talvez seja atribuída às diferentes respostas de cada isoforma ao “status” de N na planta (ARAKI & HASEGAWA, 2006).

O gene *NRT2.1* em trigo (*TaNRT2.1*) foi caracterizado, estando presente somente em uma cópia no genoma e é expresso principalmente nas raízes (YIN et al., 2007). Esse gene é o principal responsável pela absorção de  $\text{NO}_3^-$  em trigo e apresentam pico de expressão com 4 horas após a exposição do  $\text{NO}_3^-$ , apresentando 77% de homologia da sequência de aminoácidos com OsNRT2.1 (arroz) e 66% com AtNRT2.1 (*Arabidopsis*).

Estudos de localização sub-celular de *AtNRT2.1* usando GFP (Green Fluorescent Protein, proteína de fluorescência verde) mostram que esse transportador está localizado somente na membrana plasmática, logo, não possui qualquer função no acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  no vacúolo pois não está presente na membrana do vacúolo (CHOPIN et al., 2007). Para a entrada de  $\text{NO}_3^-$  no vacúolo foram caracterizados um canal de vacúolo (menor importância) e um transportador de  $\text{NO}_3^-$  (*AtCLCa*) do tipo anti-porte ( $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ ) (DE ANGELI et al., 2006).

A absorção de nitrato é um processo altamente integrado, sendo não só influenciado pela disponibilidade de N na rizosfera, mas também com a demanda de N por toda a planta. A presença do nitrato na região da rizosfera induz a sua absorção e um sistema de feedback (retroalimentação) negativo causado pelos produtos da assimilação do nitrato (principalmente amônio e glutamina) inibem a absorção de nitrato do meio (GIRIM et al., 2007). O estímulo para a absorção ocorre muito rapidamente, sendo de aproximadamente 30 minutos após a exposição ao íon e requer síntese *de novo* dos transportadores, evidenciando que a absorção de nitrato é influenciada pelo seu próprio substrato (GIRIM et al., 2007).

A parte aérea regula a absorção de nitrato pelas raízes através de moléculas sinalizadoras transportadas pelo floema para as raízes, principalmente aminoácidos, que regulam a absorção de nitrato pelas raízes por *feedback* negativo. No entanto, não é só o status de N na planta que regula a absorção de nitrato, mas também a fotossíntese, sendo os açúcares translocados da parte aérea para as raízes um mecanismo regulatório entre metabolismo de C e N (LEJAY et al., 2003).

Além da importância da família NRT para a absorção de  $\text{NO}_3^-$  do solo, essa família gênica também possui membros que atuam no fluxo interno de  $\text{NO}_3^-$ , destacando os membros da família NRT1. Os transportadores de  $\text{NO}_3^-$  de baixa afinidade estão agrupados na família gênica NRT1(PTR), juntamente com transportadores de peptídeos (TSAY et al., 2007). Essa família gênica possui 53 membros em *Arabidopsis* e 80 em arroz, no entanto, transportadores de  $\text{NO}_3^-$  não transportam peptídeos e vice-versa porque são estruturalmente distintos (CHIU et al., 2004). Diversos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  foram caracterizados em *Arabidopsis*. Além do NRT1.1 já mencionado acima, AtNRT1.2 é expresso constitutivamente somente na epiderme da raiz e atua na absorção de  $\text{NO}_3^-$  em baixa afinidade (HUANG et al., 1999). Após a absorção, o  $\text{NO}_3^-$  pode ser transportado dentro da planta, sendo AtNRT1.5 expresso nas células do periciclo e está envolvido no carregamento do xilema, sendo que mutantes desse gene apresentam reduzida translocação de  $\text{NO}_3^-$  para a parte aérea (LIN et al., 2008).

AtNRT1.4 é expresso nas células do pecíolo foliar e plantas mutantes nesse gene apresentam metade da quantidade de  $\text{NO}_3^-$  no pecíolo em relação às plantas tipo selvagem (CHIU et al., 2004). AtNRT1.6 está envolvido na transporte de  $\text{NO}_3^-$  da planta para o embrião em desenvolvimento (ALMAGRO et al., 2008).

Recentemente, o transportador AtNRT1.8 foi caracterizado e sua função principal está no descarregamento do xilema na parte aérea e raiz, sendo que mutantes para esse gene apresentam alto teor de  $\text{NO}_3^-$  acumulado no xilema e baixo teor em outras células da parte aérea (LI et al., 2010). AtNRT1.7 é expresso em células do floema e está envolvido na remobilização de  $\text{NO}_3^-$  sendo que plantas mutantes para esse gene apresentam menor desenvolvimento quando o  $\text{NO}_3^-$  está em depleção no meio (FAN et al., 2009).

Para a ativação dos transportadores de nitrato é necessária uma proteína reguladora denominada de “proteína NAR” (Nitrate Assimilation Related, ou seja, proteína relacionada à absorção de nitrato), também denominada de NRT3 por alguns autores. A evidência da necessidade dessa proteína foi realizada em oocistos, no qual o transporte de nitrato somente ocorreu quando foram injetadas as proteínas NRT2 e NAR2 juntas, enquanto a injeção separada de cada proteína não promoveu o transporte de nitrato (ZHOU et al., 2000). Os estudos em plantas também confirmaram a necessidade da proteína NAR para que ocorra o transporte de nitrato (OKAMOTO et al., 2003).

Plantas de arabis transformadas por RNAi (RNA interferente) sem a expressão de *AtNAR2.1*, apresentaram expressivo decréscimo do sistema de absorção de nitrato de alta afinidade (ORSEL et al., 2006). Quando as plantas foram cultivadas em solução com baixa concentração de nitrato (0,5 mM), somente as plantas do tipo selvagem cresceram, enquanto que as plantas sem *AtNAR2.1* não se desenvolveram. Em solução com alta concentração de nitrato, as plantas sem *AtNAR2.1* cresceram normalmente. A expressão de *AtNAR2.1* parece ser simultânea à expressão do transportador de nitrato *AtNRT2.1*, possivelmente em resposta ao “status” de N (N-amino livre e  $\text{N-NH}_4^+$ ) na planta (ARAKI & HASEGAWA, 2006). Uma mutação sítio dirigida em uma região conservada da sequência gênica da proteína NAR gerou fortes decréscimos na absorção de nitrato (KAWACHI et al., 2006). A regulação por *feedback* sofrida pelos transportadores por compostos da redução do nitrato também diminuiu a expressão de *AtNAR2.1*. Em Arabidopsis, AtNRT2.1 não está presente na membrana plasmática em plantas mutantes *nar2.1-1*, sugerindo que NAR2.1 está envolvida no endereçamento de NRT2.1 (WIRTH et al., 2007).

A localização sub-celular de AtNAR2.1 foi revelada recentemente. De forma semelhante ao AtNRT2.1, AtNAR2.1 está localizada principalmente na membrana plasmática e ausente na membrana do vacúolo (YONG et al., 2010). O complexo funciona como um tetrâmero, sendo duas subunidades de OsNRT2.1 e duas subunidades de OsNAR2.1.

A dinâmica dos transportadores de amônio difere em relação aos transportadores de nitrato. A expressão dos transportadores de amônio é controlada pelos níveis de aminoácidos na célula, principalmente glutamina (SONODA et al., 2003). Como o amônio é prontamente assimilado em esqueletos de carbono após a absorção, os teores de amônio correlacionam positivamente com os teores de N-amino livre. Os transportadores de amônio são altamente expressos pela deficiência de amônio, provocados pelo decréscimo dos teores de aminoácidos livres, de modo que o ressuprimento causa alto influxo de amônio e conseqüente redução da expressão dos transportadores de amônio (LI et al., 2006). Os níveis de glutamina gerados pela assimilação de  $\text{NH}_4^+$  regulam diversos genes envolvidos na resposta das plantas ao  $\text{NH}_4^+$ .

Outro mecanismo de regulação transcricional exercido pelo  $\text{NH}_4^+$  foi demonstrado por PATTERSON et al. (2010). Segundo esses autores, a absorção de  $\text{NH}_4^+$  que resulta na acidificação do apoplasto e conseqüentemente bombeamento de  $\text{H}^+$  pelas PM  $\text{H}^+$ -ATPases atua como sinal para a expressão de genes relacionados com a absorção de  $\text{NH}_4^+$ . Essa hipótese foi demonstrada usando um inibidor específico da glutamina sintetase (MSX), que

não permite a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  e não inibe a sua absorção. Os dois mecanismos afetam a resposta transcricional exercida pelo  $\text{NH}_4^+$ , contudo, a expressão dos transportadores de  $\text{NH}_4^+$  está diretamente relacionada com o status de N na raiz na forma de N-amino livre.

Os transportadores de amônio de alta afinidade (AMT1) são bastante estudados, destacando-se os genes *AMT1.1*, *AMT1.2* e *AMT1.3* em arroz e *Arabidopsis*. Diferentes padrões de expressão foram encontrados entre as isoformas de AMT1. A isoforma *OsAMT1.1* mostrou-se constitutiva, enquanto *OsAMT1.2* é induzida por amônio e *OsAMT1.3* reprimida (SONODA et al., 2003). A expressão do gene *AMT1.1* em arroz e *Arabidopsis* mostra o mesmo padrão, com aumento de expressão em resposta à deficiência de N e repressão em resposta ao ressuprimento de  $\text{NH}_4^+$ , sendo que *AtAMT1.1* não é regulado pelo status de N da parte aérea (GANSEL et al., 2001).

A super-expressão do gene *OsAMT1.1* (alta afinidade) aumentou a absorção de  $\text{NH}_4^+$  em altas concentrações (2 mM), conseqüentemente, o crescimento das plantas foi fortemente reduzido (HOQUE et al., 2006). O efeito inibitório no crescimento das plantas mutantes sob alta concentração de  $\text{NH}_4^+$  pode ser decorrente dos efeitos inibitórios que o  $\text{NH}_4^+$  exerce sob o crescimento vegetal quando em altas concentrações, desde consumo de esqueletos de carbono até o ciclo fútil de  $\text{NH}_4^+$  que gera consumo de ATP (BRITTO et al., 2001).

As principais isoformas envolvidas na absorção de amônio da solução do solo são *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2*, sendo *OsAMT1.1* expressa predominantemente no córtex radicular, periciclo, epiderme e pêlos radiculares (MAYER e LUDEWING, 2006). O uso da inserção de T-DNA no gene *AMT1.1* provoca redução da absorção de amônio em 70% na faixa de absorção dos HATS (KAISER et al., 2002), mostrando seu papel fundamental na absorção de amônio no solo. A isoforma *OsAMT1.2* é expressa principalmente no cilindro central, sugerindo sua importante função no transporte de amônio no interior da planta. Para a isoforma *OsAMT1.3* tem sido sugerida sua função como sinalizador da presença de nitrogênio, por ser reprimido na presença de amônio e nitrato (SONODA et al., 2003).

Em *Arabidopsis* foi demonstrado que o gene *AtAMT1.3* está envolvido na emissão e crescimento de raízes laterais, uma característica até então conhecida pelo  $\text{NO}_3^-$  (LIMA et al., 2010). *AtAMT1.1* exerce a mesma função na absorção de  $\text{NH}_4^+$  não está relacionado com a emissão e crescimento de raízes laterais.

Além da regulação transcricional exercida pelo  $\text{NH}_4^+$  sob os membros da família AMT, a regulação pós-traducional através da fosforilação do resíduo T460 de Thr na região C terminal é um importante mecanismo de regulação da absorção de  $\text{NH}_4^+$ . Com o ressuprimento de  $\text{NH}_4^+$  em plantas de *Arabidopsis*, os níveis de fosforilação no resíduo T460 no *AMT1.1* são proporcionais à dose de  $\text{NH}_4^+$  aplicado e tempo de exposição, ou seja, quanto maior a dose de  $\text{NH}_4^+$  aplicado maior será a fosforilação no *AMT1.1* inativando a absorção de  $\text{NH}_4^+$  por esse transportador (LANQUAR et al., 2009). A extremidade N-terminal da família AMT1 é fundamental para a estabilização do oligômero (três proteínas), sendo que a absorção de  $\text{NH}_4^+$  é fortemente reduzida quando o oligômero é desfeito (GRAFF et al., 2011).

## 2.2. A $\text{H}^+$ -ATPase de Membrana Plasmática (PM $\text{H}^+$ -ATPase, EC 3.6.3.6)

As PM  $\text{H}^+$ -ATPases são glicoproteínas transmembrana com importantes funções no desenvolvimento da célula vegetal. Essas proteínas são bombas eletrogênicas que hidrolisam ATP para gerar um movimento vetorial de  $\text{H}^+$  em direção ao apoplasto. O bombeamento de  $\text{H}^+$  pelas  $\text{H}^+$ -ATPases resulta em gradiente de prótons  $\Delta\mu\text{H}^+$  e gera a força próton-motriz ( $\Delta p$ ) que energiza o processo de absorção de ânions como o  $\text{NO}_3^-$  (SOUZA & FERNANDES, 2006). O bombeamento de  $\text{H}^+$  tem caráter eletrogênico, produzindo uma queda no potencial de membrana. Esta variação ( $\Delta\psi$ ) modifica o gradiente de potencial eletroquímico que, neste caso, favorece a absorção passiva de cátions como o  $\text{NH}_4^+$ .

As H<sup>+</sup>-ATPases não são encontradas em animais, nos quais as enzimas equivalentes são as Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPases (ausentes em plantas). Entretanto, ambos os tipos de bombas de prótons são evolucionariamente relacionadas à mesma superfamília das P-ATPase (SONDERGAARD, et al., 2004; GAXIOLA et al., 2007).

As PM H<sup>+</sup>-ATPases são codificadas por uma família gênica com diferentes propriedades regulatórias (CHANG et al., 2009). O seqüenciamento do genoma de arroz revelou a existência de dez isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases. Para esse elevado número de isoformas, BAXTER et al. (2003) propuseram três diferentes explicações: as diversas isoformas podem estar envolvidas em determinados tipos de células com uma única propriedade bioquímica, apresentar expressão tecido-específica com níveis de expressão apropriados a cada tecido ou as múltiplas isoformas apresentam funções redundantes.

Diversos padrões de expressão tecido específico têm sido observados entre diferentes isoformas de várias espécies, incluindo *Arabidopsis* e tabaco (ARANGO et al., 2003). Por exemplo, em *Arabidopsis* onde há 11 isoformas, *AHA10* foi identificada durante o desenvolvimento da semente (HARPER et al., 1994) e *AHA4* é expressa preferencialmente na endoderme da raiz, em flores e na maturação de síclulas (VITART et al., 2001). Em pepino, *CsHA2* é expressa em várias partes da planta, sendo abundante nas folhas, enquanto *CsHA3* é expresso predominantemente nas raízes (MŁODZINSKA et al., 2010). Como *CsHA3* é expressa predominantemente em raízes laterais, talvez essa isoforma esteja envolvida na aquisição de nutrientes da solução do solo. O gene da isoforma de PM H<sup>+</sup>-PM H<sup>+</sup>-ATPase: *AHA2*, caracterizada em *Arabidopsis*, é expresso predominantemente nas raízes, principalmente nas células da epiderme, córtex, floema e xilema (FUGLSANG et al., 2007).

Isoformas ortólogas de *Arabidopsis* e tabaco nem sempre apresentam o mesmo padrão de expressão tecido específico (ARANGO et al., 2003). No entanto, algumas funções no metabolismo vegetal são específicas para uma determinada isoforma, por exemplo, experimentos com RNA interferente impedindo a expressão da isoforma *Pm4* em tabaco, provocaram falhas no desenvolvimento, transporte de açúcares e “macho esterilidade” (ZHAO et al., 2000).

Além das PM H<sup>+</sup>-ATPases estarem envolvidas no crescimento vegetal, essa enzima desempenha papel fundamental em estresses abióticos, como na tolerância ao estresse salino por causa do transportador antiporte Na:H<sup>+</sup> na membrana plasmática, sendo que o tratamento com NaCl induziu a isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase *Osa7* em arroz (SAHU & SHAW, 2009).

Além da regulação transcricional da PM H<sup>+</sup>-ATPase, a pós-traducional é uma das vias mais importantes de regulação dessa enzima. A PM H<sup>+</sup>-ATPase é ativada por fosforilação no penúltimo resíduo de treonina (Thr), no domínio inibitório C-terminal e subsequente ligação da proteína regulatória 14-3-3 (GAXIOLA et al., 2007). BOBIK et al. (2010) estudando as isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases mais expressas em tabaco (*PMA2* e *PMA4*) desenvolveram anticorpos específicos para detectar a fosforilação de cada isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase. Esses autores verificaram nas folhas de fumo que não mais que 44% de *PMA2* e 32% de *PMA4* estão ativas (fosforiladas) em condições normais de crescimento. Esses resultados indicam que o controle pós-traducional é diferente entre as isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases e que se constitui em uma importante forma de regulação da atividade dessa enzima. A ativação pós-traducional resulta na formação de um complexo de seis PM H<sup>+</sup>-ATPases e seis proteínas 14-3-3, formando um dodecâmero (OTTMANN et al., 2007). No entanto, uma isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase não forma dodecâmero com outra isoforma. As isoformas *PMA2* e *PMA4* não formam estrutura em conjunto, sugerindo que essas duas isoformas que pertencem a duas diferentes subfamílias possuem diversas propriedades regulatórias da atividade (BOBIK et al., 2010).

A superexpressão de uma isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase pode não gerar modificações na atividade dessa enzima por causa de sua regulação pós-traducional. A clonagem e super-

expressão do gene completo de *PMA4* (wtPMA4) aumentou atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase *in vitro* e bombeamento de H<sup>+</sup>, no entanto, não alterou o crescimento vegetal e pH apoplástico (GÉVAUDANT et al., 2007). Quando houve a superexpressão do gene de PMA4 truncado ( $\Delta$ PMA4, ou seja, sem os 103 últimos resíduos, correspondentes à extremidade regulatória C-terminal), não foi observada maior atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase e bombeamento de H<sup>+</sup>, mas foi verificado menor pH apoplástico, ou seja, maior atividade *in vivo* (GÉVAUDANT et al., 2007). Foi verificado também que plantas superexpressando wtPMA4 apresentavam maior quantidade de enzima, evidenciando o controle pós-traducional. Plantas superexpressando  $\Delta$ PMA4 apresentaram maior tolerância ao estresse salino, enquanto as plantas superexpressando wtPMA4 não apresentaram diferenças em comparação às plantas normais. Esses autores indicam que a atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase *in vitro* (medido pela atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase e bombeamento de H<sup>+</sup>) pode diferir da atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase *in vivo* (pH apoplástico).

As principais isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase em *Arabidopsis* são *AHA1* e *AHA2* (mais expressas). Plantas mutantes sem a expressão de *AHA1* ou *AHA2* usando T-DNA geraram menor atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase, menor bombeamento de H<sup>+</sup>, menor atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase *in vivo* e menor crescimento (HARUTA et al., 2010). A mutação de *AHA1* e *AHA2* simultânea foi letal. Esses resultados mostram que isoformas específicas de PM H<sup>+</sup>-ATPase tem maior importância no crescimento vegetal, pois mesmo que codifiquem para a mesma enzima, isoformas mais expressas tem maior importância no desenvolvimento vegetal.

### 2.3. Relação entre a Absorção de Nutrientes e a PM H<sup>+</sup>-ATPase

Uma das primeiras evidências de que as PM H<sup>+</sup>-ATPases estão envolvidas na absorção de nutrientes foi feita por SANTI et al. (1995), que observaram que plântulas de milho quando supridas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentavam maior atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase com pico às 8 horas. SANTI et al. (2003) verificaram em milho que o aumento da absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é acompanhado pelo aumento de expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases *MHA3* e *MHA4*, resultando no aumento de atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases. No entanto, outras isoformas ainda desconhecidas em milho podem estar atuando na absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

LIU et al. (2008) observaram que plantas supridas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram maior crescimento de raízes laterais acompanhado de maior expressão de *ZmMHA4*, assim como outros genes envolvidos na absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (*ZmNRT2.1*), crescimento e divisão celular (expansina, *ZmExpA1*) e aquaporinas (*ZmTIP2-3*). Nesse mesmo artigo os autores observaram que a expressão da isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase (*ZmMHA4*) está envolvida no crescimento de raízes laterais, de acordo com a teoria do crescimento ácido. Outros autores verificaram resposta de expressão de PM H<sup>+</sup>-ATPase em milho em resposta ao suprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (SANTI et al., 2003, QUAGGIOTTI et al., 2003).

Isoformas específicas de PM H<sup>+</sup>-ATPase atuam no processo de absorção de nutrientes do solo. Foi verificado que as isoformas *AHA2* e *AHA7* responderam à deficiência de ferro (Fe) em *Arabidopsis* (SANTI et al., 2009). Em raízes de pepino, transcritos de *CsHA1* acumulam nas raízes em resposta à deficiência de Fe, enquanto que o nível de transcritos de *CsHA2* não é alterado (SANTI et al., 2005). CHANG et al. (2009) usando uma linhagem de *Tos17* com a isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase *OsA8* silenciada, verificaram seu envolvimento na absorção e translocação de fósforo (P). O silenciamento de *OsA8* afetou a expressão de outras isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase e transportadores de P, além de diminuir o conteúdo de P na parte aérea. No entanto, ainda não é conhecido quais isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases estão envolvidas na absorção e translocação de N em arroz.

Na deficiência de P os transportadores de fósforo (PT) são induzidos. SHEN et al. (2006) demonstrou que em soja a deficiência de P não somente induz a maior atividade da

PM H<sup>+</sup>-ATPase mas também a expressão de um gene de PM H<sup>+</sup>-ATPase (AF091303), mostrando a função dessa enzima na adaptação à diversos estresses ambientais.

Na absorção de K a PM H<sup>+</sup>-ATPase desempenha papel fundamental na manutenção do equilíbrio de cargas entre o apoplasto e o citossol. O uso de vanadato (inibidor de atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase) diminuiu a absorção de K, enquanto que a aplicação de fusicocina (toxina fúngica que atua irreversivelmente a PM H<sup>+</sup>-ATPase) levou ao aumento da absorção de K (BUCHER et al., 2006).

Nos bancos de dados, a busca por genes expressos têm sido facilitada com o uso de ESTs (Expressed Sequences Tags, fragmentos de seqüências expressas), que são pequenas porções de um gene expresso que após o seqüenciamento servem para identificar genes desconhecidos ou mapear sua posição dentro do genoma (RUDD, 2003). Os ESTs podem ser facilmente acessados em banco de dados *on-line* como o NCBI (National Center for Biotechnology Information) e TIGR (The Institute Genomic Research), permitindo saber se o gene de interesse está sendo expresso e em qual parte da planta. Somente as isoformas *OsA2*, *OsA3*, *OsA7* e *OsA9* apresentaram ESTs em raízes de arroz (respectivamente, 11, 2, 156 e 1 ESTs). A isoforma *OsA7* foi a que teve maior número de ESTs em raízes de arroz, enquanto que ESTs da isoforma *OsA10* foram encontradas na panícula no estágio de florescimento (BAXTER et al., 2003). Um panorama geral dos ESTs das PM H<sup>+</sup>-ATPases de arroz está disponibilizado na tabela anexa 1.

Da mesma forma que a expressão dos transportadores de nitrato (ARAKI & HASEGAWA, 2006), os transportadores de amônio (SONODA et al., 2003) foram caracterizados em relação ao ressuprimento de N, enquanto a família das PM H<sup>+</sup>-ATPases ainda necessita de estudos de expressão para verificar genes dessa família, importantes para a absorção de N do solo. No entanto, os estudos relatando a expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases e absorção de N abordaram isoformas específicas (SANTI et al., 2003; QUAGGIOTTI et al., 2004), não considerando toda a família gênica das PM H<sup>+</sup>-ATPase.

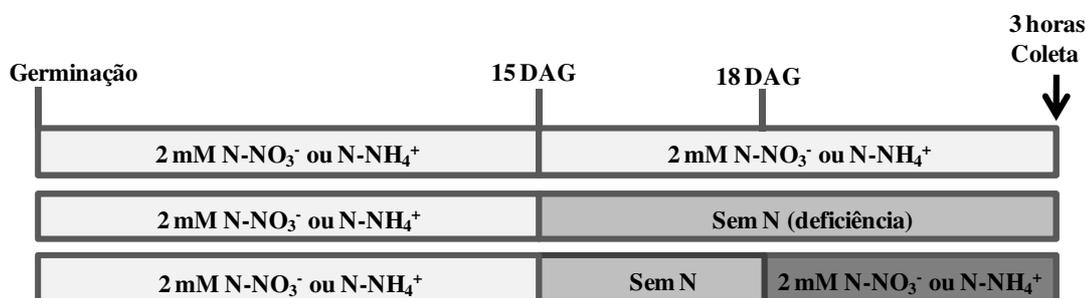
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Expressão das Isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase e Transportadores de nitrato e amônio em Resposta a Deficiência e Ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em Plantas de Arroz da Variedade Nipponbare - Experimento I

##### 3.1.1 Cultivo e condução do experimento das plantas de arroz variedade Nipponbare usando N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

O cultivo das plantas foi realizado em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

Sementes de arroz (*Oryza sativa* L. cv Nipponbare) foram previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos e depois lavadas várias vezes com água destilada. Em seguida foram transferidas para potes contendo somente água destilada onde uma gaze foi usada para impedir a imersão das sementes. Seis dias após a germinação, as plântulas foram transferidas para vasos com volume de 700 ml com quatro plantas por vaso, usando solução de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950) modificada com ¼ da força iônica total, onde um grupo recebeu 2 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fonte de N e outro 2 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O pH da solução no experimento com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foi 5,5 e no experimento com N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 6,0. Após três dias, as plantas receberam solução de Hoagland modificada com ½ força iônica, continuando um grupo com 2 mM de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fonte de N e outro com 2 mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A partir de então, esta mesma solução foi repostada a cada três dias. Um esquema da condução do experimento I é apresentado na Figura 1.



DAG: dias após a germinação.

**Figura 1.** Modelo do experimento I usando a variedade de arroz Nipponbare para estudo da expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase, quando sob cultivo constante em 2 mM de nitrato ou amônio, deficiência de N e deficiência de N seguida de ressuprimento com 2 mM de nitrato ou amônio. Foram feitos dois diferentes experimentos: um com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e outro com N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de N.

Quinze dias após a germinação, 2/3 dos vasos de cada grupo receberam solução de Hoagland modificada sem nitrogênio, enquanto o restante continuou recebendo a solução de Hoagland com 2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Dezoito dias após a germinação, a metade dos vasos com solução sem nitrogênio voltou a receber solução com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (ressuprimento), enquanto a outra metade permaneceu sem N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por três dias (deficiência). Assim, houve três tratamentos: um grupo permaneceu constantemente com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (controle), outro foi submetido a um período de deficiência de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por 75 horas e o último que foi submetido ao ressuprimento com 2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou com N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> após 72 horas de deficiência.

Três horas após o início dos tratamentos, as plantas foram divididas em parte aérea e raiz e amostras separadas para extração do RNA total, frações solúveis (N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e N-amino livre) e extração de vesículas de PM H<sup>+</sup>-ATPases. Foram coletados também 2 ml de solução nutritiva para calcular o influxo aparente de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pela depleção do nutriente.

### **3.1.2. Avaliação da expressão gênica da PM H<sup>+</sup>-ATPase (*Osa1* a *Osa10*) e transportadores de nitrato (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e amônio (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*)**

#### **a) Extração de RNA total e síntese de cDNA**

O RNA total foi extraído segundo GAO et al. (2001) utilizando tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS). Amostras de parte aérea e raiz foram maceradas em N<sub>2</sub> e homogeneizadas em uma mistura contendo 4,5 ml de tampão NTES e 3 ml de solução fenol:clorofórmio (1:1). Após centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de 2 M acetato de sódio pH 4,8 (NaOAc<sub>DEPC</sub>) e 1 volume de isopropanol puro gelado. A seguir a mistura foi mantida a -20 °C por 2 horas seguida de centrifugação a 12.000 x g por 10 min. O precipitado foi solubilizado em 2,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> e precipitado novamente pela adição de 2,5 mL de 4 M cloreto de lítio pH 4,8 (LiCl<sub>DEPC</sub>). Após centrifugadas a 12.000g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 0,1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>.

A qualidade do RNA extraído foi verificada espectrofotometricamente por meio das relações A<sub>260</sub>/A<sub>230</sub> e A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> e visualização em gel de agarose (1%) com brometo de etídio. As amostras de RNA total utilizadas nas reações de síntese do cDNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A fita simples de cDNA foi sintetizada utilizando a “TaqMan Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems) e primer oligodT de acordo com as recomendações do fabricante.

#### **b) PCR em Tempo Real dos genes que codificam para as PM H<sup>+</sup>-ATPases, transportadores de nitrato e transportadores de amônio em arroz variedade Nipponbare**

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o kit “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto e finalmente a curva de dissociação com aumento de temperatura de 0,3°C de 60°C até 95°C para verificar a especificidade da reação. O gene da actina foi usado como controle (JAIN et al., 2006).

Os primers foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express (Tabela 1).

A especificidade dos primers foi analisada por alinhamento das seqüências nos bancos de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e experimentalmente ao fim da reação de PCR durante a “*curva de melting*”. Todos os primers usados apresentaram especificidade para cada gene analisado.

Os cálculos de expressão foram feitos de acordo com LIVAK e SCHMITTGEN (2001) usando o tratamento com suprimento constante como controle, a partir dos valores de C<sub>T</sub> (*Cycle Threshold*, ciclo limite) obtidos na reação de PCR em tempo real.

**Tabela 1.** Sequências dos primers usados nas reações de PCR em tempo real para os dez genes das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases (*OsA1* a *Os10*), três isoformas de transportadores de nitrato (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e amônio (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*), actina (*OsAct11*) de arroz, números de íntrons e éxons e acessos nos bancos de dados TIGR e NCBI.

Gene	Primers Forward/ Reverse	Íntron_Éxon	Acesso TIGR	Acesso NCBI
<i>OsA1</i>	5'-TGGGCACATGCACATAGGA-3' 5'-GCTCACTGTAGCCGGTCTTCTC-3'	20_21	LOC_Os03g48310	NM_001057482.1
<i>OsA2</i>	5'-GCAGAAGAGGCCCGTAGGA-3' 5'-CAGGGTGGTCAGCTCTCTCAA-3'	20_21	LOC_Os07g09340	NM_001065628.1
<i>OsA3</i>	5'-AATTCTGCAATCACCTACGTGTACTT-3' 5'-GCTGGAGCAGGAGGGACAA-3'	20_21	LOC_Os12g44150	NM_001073914.1
<i>OsA4</i>	5'-CGTCGAGTCCGGTGGTCAAG-3' 5'-CGGTGTAGTGGTCTCGGATGGT-3'	11_12	LOC_Os05g25550	NM_001061721.1
<i>OsA5</i>	5'-CGGCGTCATCTGGCTCTAC-3' 5'-GACGGCGAACTTGAAGATGTC-3'	---	----	NM_001067873.1
<i>OsA6</i>	5'-AGAGTCGGTGGTGAAGCTCAA-3' 5'-CGATGGCATGCTGTATGTTACA-3'	3_4	LOC_Os02g55400	NM_001054930.1
<i>OsA7</i>	5'-TCGACACGATCCAGCAGAAC-3' 5'-GCTGATGACGATCTCTCGTTGA-3'	14_15	LOC_Os04g56160	NM_001060653.1
<i>OsA8</i>	5'-TGTTTAACTACAACACGACAATGC-3' 5'-AATGGGATGGGAAAAGGAAAATAC-3'	19_20	LOC_Os03g01120	NM_001055182.1
<i>OsA9</i>	5'-GTTCTACGCCCCCTCGAT-3' 5'-CTTCTGTGCAACAGCAGGTT-3'	19_20	LOC_Os03g08560	NM_001055720.1
<i>OsA10</i>	5'-CGCCGAGGTCGCAAGAT-3' 5'-CGCTCAAACCACGCAAAC-3'	2_3	LOC_Os06g08310	NM_001063515.1
<i>OsNRT1.1</i>	5'-CGAGGTTGGTGCATTTTGTG-3' 5'-GCCGTGGTGTCTCTTTTTTTT-3'	2_3	LOC_Os08g05910.1	NM_001067555.1
<i>OsNRT2.1</i>	5'-GCGACCGAGACCAGCAATAC-3' 5'-TTCATCACCGTTGCAACAAG-3'	0_1	LOC_Os02g02170.1	NM_001052193.1
<i>OsNRT2.2</i>	5'-GCCGAGCAGCCTAAT-3' 5'-AAACGGTAACAAAACGTTCAACAG-3'	0_1	LOC_Os02g02190.1	NM_001052194.1
<i>OsAMT1.1*</i>	5'-CGTGCCGTGTCAGGTCAT-3' 5'-GGTCATCTTCGGGTGGGTCA-3'	2_1	LOC_Os04g43070.1	NM_001059816.1
<i>OsAMT1.2*</i>	5'-GAAGCACATGCCGCAGACA-3' 5'-GACGCCGACTTGAACAGC-3'	1_1	LOC_Os02g40710.1	NM_001053990.1
<i>OsAMT1.3*</i>	5'-GCGAACCGCAGCGACTA-3' 5'-GACCTGTGGGACCTGCTTG-3'	2_1	LOC_Os02g40730.1	NM_001053991.1
<i>OsAct11</i>	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3' 5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3'	3_4	LOC_Os03g50885.1	NM_001057621.1

\*Para os genes *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* foram usados os primers desenhados por DUAN et al. (2007).

### 3.1.3 Análises de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-amino livre e açúcares solúveis em tecido vegetal

Amostras de 0,5 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 (YEMM & COCKING, 1955), N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (FELKER, 1977), N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (CATALDO et al., 1975) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1954).

### 3.1.4 Determinação da absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

A absorção foi determinada pela depleção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em solução nutritiva. Foram retiradas amostras de solução nutritiva de 2,0 ml no início do tratamento e após seis horas de exposição ao NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. A absorção líquida foi determinada proporcional ao peso fresco de raiz, sendo expressa em μmoles de N absorvido por grama de peso fresco por hora. Os teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram determinados de acordo com CATALDO et al. (1975) e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por FELKER (1977).

### 3.1.5 Avaliação da atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases

#### a) Extração das vesículas contendo a PM H<sup>+</sup>-ATPase

Após a separação das plantas em raiz e parte aérea, a extração das vesículas de plasmalema e atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases foram realizadas de acordo com FAÇANHA e

DE MEIS (1995) e SANTOS et al. (2009). Amostras de raiz e parte aérea foram maceradas com tampão de extração gelado (Tris-Cl 50 mM (pH 8,0), sacarose 250 mM, glicerol 100 mL/L, KI 150 mM, cloreto de colina 100 mM, EGTA 2 mM, EDTA 2 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 10 g/L, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mM, ditioneitol (DTT) 5 mM, 2-mercaptoetanol 5 mmol/L e 5 g/L de albumina). Após filtrar o homogenato em quatro camadas em gaze foi realizada uma centrifugação a 3.600 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 8.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e agora centrifugado a 105.000g por 1 hora. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado com 2 mL de um meio contendo: Tris-HCl 30 mM (pH 7,5), glicerol 150 mL/L, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, DTT 2 mM e PMSF 1 mM. Em seguida este material foi colocado sobre um gradiente de sacarose de 430 g/L-300 g/L-100 g/L e centrifugado a 105.000g por 1 hora. As vesículas de plasmalema e tonoplasto foram separadas por densidade de flutuação e formaram bandas que puderam ser coletadas e diluídas em meio de suspensão na proporção de 2:1 (meio:banda). As frações de plasmalema e tonoplasto agora separadas foram submetidas a uma centrifugação de 105.000g durante 40 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em 1 mL de meio de suspensão, congelado em N<sub>2</sub> líquido e armazenado a -80 °C para posteriores análises. O conteúdo de proteína dos extratos foi determinado de acordo com BRADFORD (1976) utilizando albumina de soro bovino como padrão.

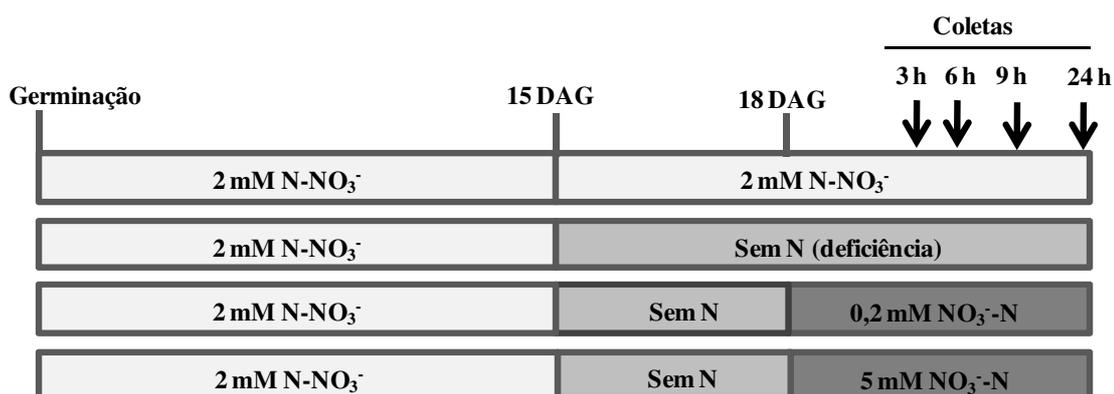
#### **b) Atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase**

A atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases foi realizada de acordo com SANTOS et al. (2009) usando meio de reação composto de MOPS-BTP 30 mM (pH 6,5), MgSO<sub>4</sub> 5 mM, KCl 50 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 mM, 0,2 mL/L de Triton X-100, KNO<sub>3</sub> 50 mM, NaN<sub>3</sub> 1 mM e ATP 5 mM. Para cada amostra foi feito um branco usando vanadato 0,2 mM (inibidor da atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases). A reação foi iniciada com a adição de 0,5 µg de proteína no meio de reação, com incubação a temperatura constante de 30 °C. Após 1 hora de incubação foi adicionado a cada tubo 1 ml do meio de parada (2% v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5% p/v de SDS, 0,7% p/v de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>) e 50 µL de ácido Ascórbico 10% p/v. Após 10 minutos foi adicionado 1,45 mL do meio contendo citrato (4% de citrato de sódio e 2% ácido acético glacial) para evitar desenvolvimento adicional da coloração. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 820 nm.

### **3.2. Efeito do Ressuprimento e Deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sobre a Expressão e Atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase, Transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e Proteínas NAR nas Variedades de Arroz Piauí e IAC-47 - Experimento II.**

#### **3.2.1 Cultivo e condução do experimento das plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí usando N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>**

As plantas foram cultivadas conforme descrito no experimento I, com algumas modificações (Figura). Foram utilizadas as variedades de arroz Piauí (adaptada à disponibilidade diferencial de N) e IAC-47 (melhorada, para altas doses de nutrientes). Foram usados quatro tratamentos: (i) suprimento constante com 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (ii) deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por três dias, (iii) ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> após três dias de deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (iv) ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> após três dias de deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As coletas foram feitas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o ressuprimento.



DAG: dias após a germinação.

**Figura 2.** Modelo do experimento II usando as variedades de arroz IAC-47 e Piauí para estudo da expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase e transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### 3.2.2. Avaliação da expressão gênica das PM H<sup>+</sup>-ATPases (*Osa2* e *Osa7*) e transportadores de nitrato (*OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e proteínas NAR (*OsNAR2.1*)

Os procedimentos para extração de RNA total, síntese de cDNA e PCR em tempo real são os mesmos descritos anteriormente nos itens 3.1.2.1 e 3.1.2.2, respectivamente. Os primers usados foram os mesmos apresentados na tabela 1, com o acréscimo dos primers forward e reverso usados para *OsNAR2.1* 5'-AAGACGCAGGTGTTTCCTCTCC-3' e 5'-ACTTCACCGTGCTTGGGC-3', respectivamente.

### 3.2.3 Análise de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, N-amino livre; absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase e atividade da Nitrato redutase

Foram realizadas de acordo com os itens 3.1.3 a 3.1.5. A atividade da Nitrato Redutase foi feita de acordo com JAWORSKI (1971).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Expressão das Isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases e Transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em Resposta a Deficiência e Ressuprimento de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em Plantas de Arroz da Variedade Nipponbare - Experimento I

Das dez isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases estudadas, foi possível detectar a expressão de sete nas raízes de arroz: *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA4*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* (Figuras 3a e c). Na parte aérea, foi detectada a expressão de seis isoformas: *OsA1*, *OsA2*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* (Figuras 3b e d). As isoformas *OsA6*, *OsA9* e *OsA10* apresentaram expressão extremamente baixa ou simplesmente não foram expressas.

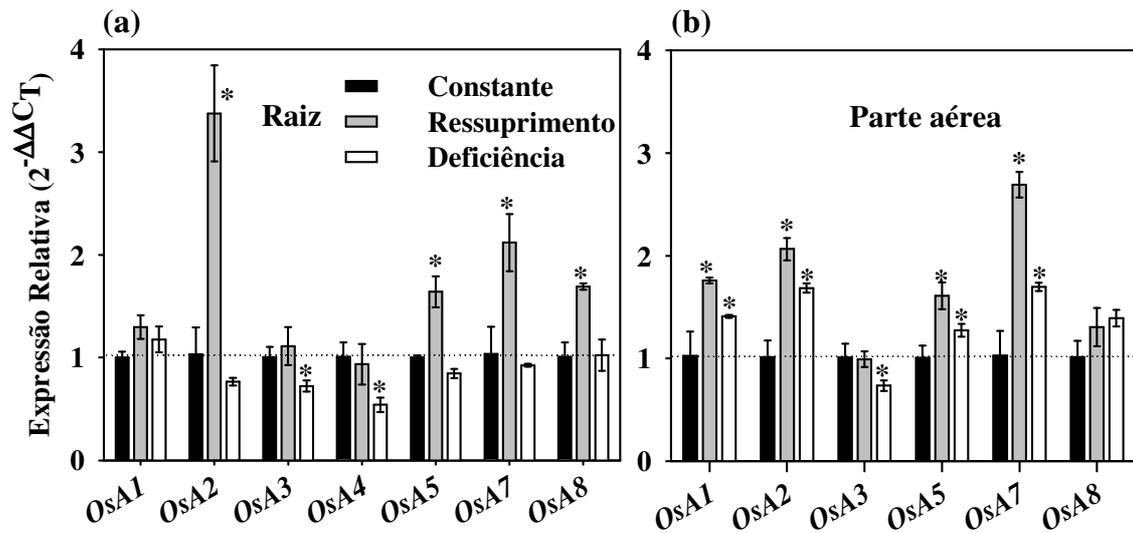
As análises de PCR em tempo real mostraram que as isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases são reguladas transcricionalmente de maneira distinta pelo ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura). As isoformas *OsA2*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* foram induzidas nas raízes quando houve ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sendo a *OsA2* induzida cerca de três vezes (Figura 3a). Nas plantas que permaneceram sem NO<sub>3</sub><sup>-</sup> durante três dias, nenhuma isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase foi induzida na raiz (Figura 3a). Por outro lado, na parte aérea foi observada indução das isoformas *OsA1*, *OsA2*, *OsA5* e *OsA7* tanto no ressuprimento quanto na deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, com maiores níveis de indução no ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 3b). As isoformas *OsA2* e *OsA7* foram as mais induzidas entre as isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases no ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> tanto na raiz quanto na parte aérea (Figura 3a e 1b). As isoformas *OsA3* e *OsA4* foram reprimidas na deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes (Figura 3a), enquanto na parte aérea *OsA3* foi reprimida pela deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 3b).

Quando as plantas foram cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, houve indução das isoformas *OsA1*, *OsA3* e *OsA7* nas raízes em resposta ao ressuprimento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 3c). As isoformas de *OsA3*, *OsA5* e *OsA7* foram reprimidas na deficiência de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes (Figura 3c). A isoforma *OsA7* foi a mais induzida pelo ressuprimento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, sendo de aproximadamente duas vezes. Na parte aérea, somente a isoforma *OsA1* apresentou aumento significativo de expressão em relação ao controle (suprimento constante de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), tanto no ressuprimento quanto na deficiência (Figura 3d).

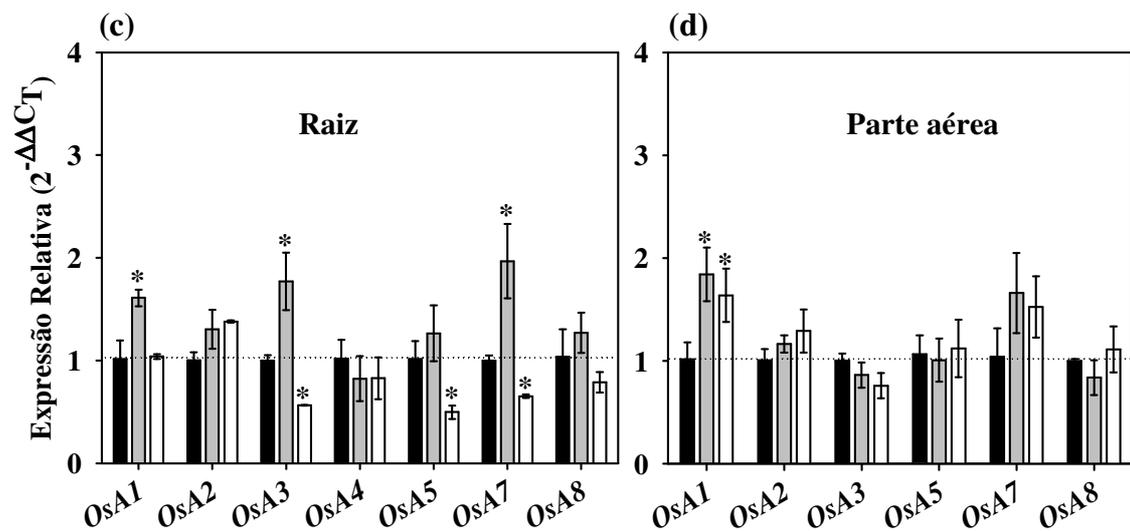
As H<sup>+</sup>-ATPases de membrana plasmática são divididas em cinco subfamílias distintas (OUFATTOLE et al., 2000), sendo sugerido que os membros da subfamília I (*OsA1*, *OsA2* e *OsA3*) e subfamília II (*OsA5* e *OsA7*) são altamente expressos, enquanto que os membros da subfamília III (*OsA9*), subfamília IV (*OsA4*, *OsA6* e *OsA10*) e subfamília V (*OsA8*) são pouco expressos sob condições normais ou possuem expressão restrita a células específicas (ARANGO et al., 2003). Isso está de acordo com o nosso experimento onde não foi encontrada expressão das isoformas *OsA6*, *OsA9*, *OsA10* nas raízes enquanto que a isoforma *OsA4* só foi encontrada nas raízes (Figura 3). Com exceção da isoforma *OsA8* pertencente a subfamília V que foi induzida por NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes, somente isoformas pertencentes à subfamília I e II foram induzidas por NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas condições deste experimento (Figura 3). A isoforma *OsA8* também tem sido relacionada com a aquisição e transporte de fósforo em arroz (CHANG et al., 2009).

É possível que as isoformas *OsA6*, *OsA9* e *OsA10* sejam expressas em outros tecidos ou em diferentes estágios de desenvolvimento. Por exemplo, a isoforma *OsA10* é expressa em panículas de arroz no estágio de florescimento (BAXTER et al., 2003). ZHU et al. (2009) observaram nas raízes a expressão da isoforma *OsA9*, mas não da isoforma *OsA5*. CHANG et al. (2009) não verificaram a expressão de *OsA5*, *OsA9* e *OsA10* em raízes de arroz.

Experimento com  $\text{N-NO}_3^-$



Experimento com  $\text{N-NH}_4^+$



**Figura 3.** Expressão relativa das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases nas raízes (a e c) e parte aérea (b e d) de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com  $\text{NO}_3^-$  (A e B) ou  $\text{NH}_4^+$  (c e d) com suprimento constante de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  ou deficiência por 75 horas de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . O tratamento controle (2 mM constante com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) foi assumido como tratamento de referência com valor igual a 1. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de  $\text{N-NO}_3^-$  ou  $\text{N-NH}_4^+$  (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições. O gene da actina (*OsAct11*) foi usando como referência.

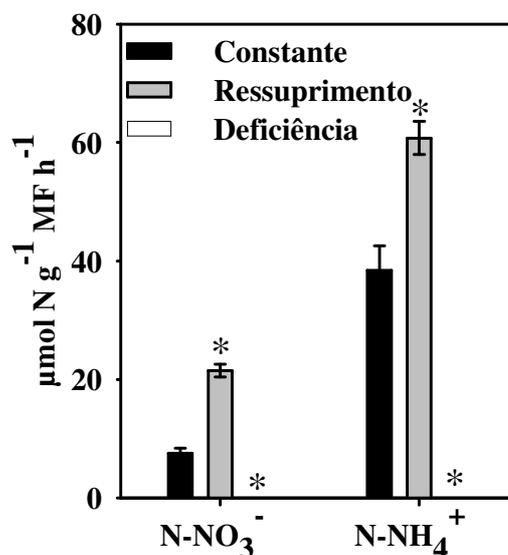
A indução de mais de três vezes para isoforma *OsA2* e de mais de duas vezes para *OsA7* quando do ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3a e b) pode indicar que essas duas isoformas têm importante papel na aquisição e transporte de  $\text{NO}_3^-$  em arroz. No ressuprimento com  $\text{NH}_4^+$  a isoforma *OsA2* não apresentou indução, enquanto *OsA7* foi a mais induzida nas raízes (Figura 3c), mostrando que possivelmente *OsA7* é uma isoforma chave para a absorção

de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . QUAGIOTTI et al. (2003), em estudo com híbridos de milho, não encontraram diferenças na expressão da isoforma de PM  $\text{H}^+$ -ATPase *MHA1* em resposta ao  $\text{NO}_3^-$ . Verificamos que das dez isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases reveladas pelo seqüenciamento do genoma do arroz (BAXTER et al., 2003), as isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases *OsA2*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* foram induzidas pelo ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3a), as quais podem estar diretamente envolvidas no processo de aquisição de N em plantas de arroz.

As isoformas *OsA1*, *OsA2*, *OsA5* e *OsA7* sofreram indução na parte aérea tanto pelo ressuprimento quanto pela deficiência de N- $\text{NO}_3^-$ , enquanto apenas a isoforma *OsA1* foi induzida pelo ressuprimento e deficiência de N- $\text{NH}_4^+$  na parte aérea (Figura 3). A indução dessas isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases no experimento com  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea em resposta ao ressuprimento e deficiência (Figura 5) pode ser devido a necessidade da energização do transporte deste nutriente entre raiz e parte aérea ou da própria redistribuição interna do  $\text{NO}_3^-$  oriundo do processo de remobilização (SONDERGAARD et al., 2004, SANTOS et al., 2009).

Uma das principais funções das PM  $\text{H}^+$ -ATPases é manter o potencial de membrana durante a absorção de nutrientes (Palmgren e Harper, 1999). A absorção de  $\text{NO}_3^-$  provoca despolarização da membrana devido ao influxo de  $\text{H}^+$  ( $1 \text{ NO}_3^- / 2 \text{ H}^+$ ), enquanto que na absorção de  $\text{NH}_4^+$ , os  $\text{H}^+$  provenientes da assimilação precisam ser bombeados para o apoplasto a fim de atingir um equilíbrio de cargas no citossol. No entanto, é difícil especular porque diferentes isoformas foram induzidas entre as fontes de N usadas no ressuprimento. Talvez isso tenha acontecido devido ao pré-tratamento aplicado, ou seja, as plantas que receberam ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  foram aquelas cultivadas permanentemente com esse nutriente, enquanto que as plantas que receberam ressuprimento com  $\text{NH}_4^+$  foram cultivadas permanentemente com  $\text{NH}_4^+$ . Por outro lado, as PM  $\text{H}^+$ -ATPases participam em diversos processos metabólicos e pouco se sabe sobre a sinalização e rotas de transdução de sinais envolvidas na expressão das diferentes isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases (DUBY & BOUTRY, 2009, ZHU et al., 2009).

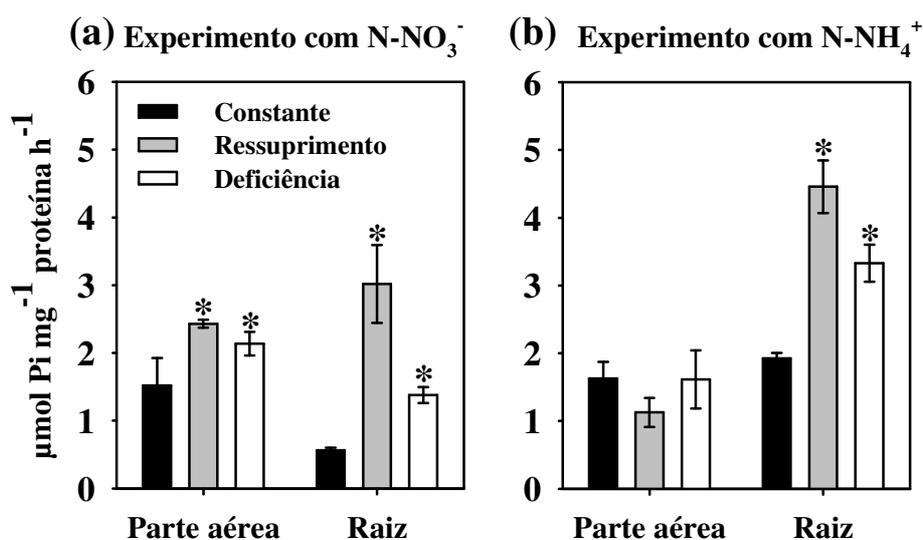
Foi observada maior velocidade de influxo de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  nas plantas submetidas ao ressuprimento desses nutrientes após um período de 72 horas sem N na solução nutritiva (Figura 4). O aumento do influxo aparente com o ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  foi acompanhado de maior expressão das PM  $\text{H}^+$ -ATPases (Figura 3), resultando em maior atividade dessa enzima (Figura 5). No entanto, foi observado que o padrão de expressão das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases nas raízes e parte aérea foram diferentes nos experimentos com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3). Estes resultados distintos podem ser reflexos do comportamento dessas fontes de N sobre o metabolismo das plantas, sendo que o  $\text{NH}_4^+$  é absorvido e assimilado nas raízes, enquanto o  $\text{NO}_3^-$  pode ser armazenado nos tecidos radiculares ou da parte aérea (SANTOS et al., 2009). Somente a isoforma *OsA7* foi induzida nas raízes por ambas as fontes de N (Figura 3a e 1c). As isoformas *OsA2*, *OsA5* e *OsA8* foram induzidas somente nas raízes das plantas com ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$ , enquanto *OsA1* e *OsA3* foram induzidas somente com o ressuprimento de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3). ZHU et al. (2009) verificaram em arroz sob suprimento constante de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  que as isoformas *OsA1*, *OsA3*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* foram induzidas sob baixo pH (3,0) na solução nutritiva. Estes autores verificaram também que as mesmas isoformas induzidas por  $\text{NO}_3^-$  foram induzidas por  $\text{NH}_4^+$  sob baixo pH na solução nutritiva. Os nossos resultados mostram que diferentes isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases são induzidas quando as plantas são submetidas a um ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3). Assim, a isoforma *OsA2* foi induzida apenas quando sob ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$ , não respondendo ao ressuprimento de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3).



**Figura 4.** Taxa de absorção de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> da solução nutritiva em plantas de arroz da variedade Nipponbare três horas após o início dos tratamentos, em experimentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, com suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições.

A atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases também foi maior nas raízes das plantas sob ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, no entanto com amplitude diferente para estes nutrientes. Houve aumento de mais de cinco vezes na atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases após ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e mais de três vezes no ressuprimento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 5). Quando as plantas foram cultivadas sob deficiência de ambas as formas de N por três dias, foi observado maior atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases em relação ao suprimento constante de (Figura 5). A maior expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases com o ressuprimento de ambas as formas de N resultou também em maior atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases (Figuras 3 e 5).

Resultados similares foram obtidos em milho, onde o tratamento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> gerou aumento de expressão das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases *MHA3* e *MHA4* e resultou também em maior atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases (SANTI et al., 2003). De acordo com esses autores, *MHA3* e *MHA4* pertencentes à subfamília II das PM H<sup>+</sup>-ATPases estão envolvidas na atividade de PM H<sup>+</sup>-ATPase em resposta ao NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, enquanto membros da subfamília I parecem não estar envolvidos nessa resposta em milho. As análises de expressão entre as dez isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases identificadas em arroz mostraram que membros da subfamília I também sofrem indução com o ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes, assim como *Osa8* pertencente à subfamília V com o ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 3a). Nossos resultados sugerem que provavelmente membros das subfamílias I e II de PM H<sup>+</sup>-ATPases estariam relacionadas com a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em raízes de arroz.



**Figura 5.** Atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases na parte aérea e raiz de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (a) ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (b) submetidas a suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições.

O período de deficiência de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aplicados nos tratamentos de ressuprimento e deficiência resultou em maior peso fresco de raízes e maior relação raiz:parte aérea nesses tratamentos, quando comparados ao controle (cultivo constante com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Tabela 2). Na parte aérea das plantas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> houve maior atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases sob ressuprimento e deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, enquanto que nas plantas cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi observada maior atividade somente no ressuprimento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Figura 5).

Não houve diferenças na massa fresca da parte aérea das plantas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, enquanto que nas plantas cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a maior massa fresca foi obtida sob suprimento constante de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Tabela 2). A massa fresca total das plantas cultivadas com NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foi maior que a das plantas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, entretanto em ambos os casos, a relação raiz:parte aérea foi maior nos tratamentos que passaram pelo período de deficiência (Tabela 2). Esse maior crescimento proporcional das raízes no ressuprimento ou deficiência foi acompanhado por maiores atividades das PM H<sup>+</sup>-ATPases na raiz (Figura 5).

Também foi observada correlação positiva entre a atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases (Figura 5) e a massa fresca nas raízes das plantas sob deficiência de N por três dias, em comparação ao tratamento com suprimento constante em ambas as formas de N (Tabela 2). SANTOS et al. (2009) sugerem que a deficiência de N sinaliza para maior atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases, necessárias para a acidificação da parede celular e crescimento radicular (HAGER et al., 2003; LI et al., 2005). Não foi verificada indução das isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPase nas raízes sob deficiência de N em comparação ao tratamento controle (Figura 3a e 3c), podendo ser a maior atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases provocada pelo controle pós-traducional dessa enzima.

**Tabela 2.** Massa fresca (g / 4 plantas) e razão raiz:PA das plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas durante dezoito dias em câmara de crescimento em solução contendo 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou 2,0 mM de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de modo constante, com ressuprimento de 2 mM N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou 2 mM de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> após 72 horas de deficiência ou com deficiência de N durante 75 horas.

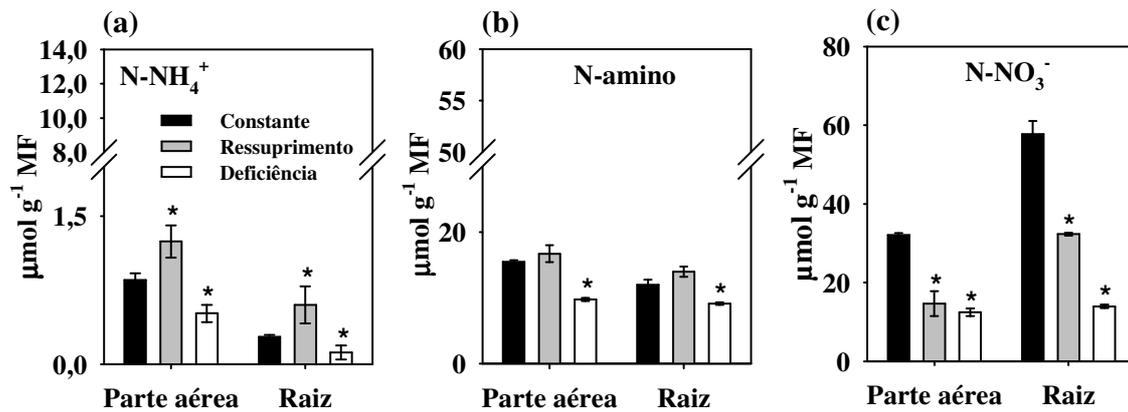
<b>Plantas cultivadas com N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>				
	Massa fresca total	Parte aérea (PA)	Raiz	Razão
Tratamento	Massa (g / 4 plantas)	Masa (g / 4 plantas)	Massa (g / 4 plantas)	raiz:PA
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> constante	1,21 <sup>a</sup>	0,81a	0,40b	0,49b
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ressuprimento	1,28a	0,78a	0,50a	0,64a
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> deficiência	1,25a	0,77a	0,48a	0,62a
<b>Plantas cultivadas com N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b>				
	Massa fresca total	Parte aérea (PA)	Raiz	Razão
Tratamento	Massa (g / 4 plantas)	Massa (g / 4 plantas)	Massa (g / 4 plantas)	raiz:PA
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> constante	1,51a	1,04a	0,47b	0,45b
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ressuprimento	1,55a	0,91b	0,64a	0,70a
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> deficiência	1,49a	0,89b	0,60a	0,67a

<sup>a</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05).

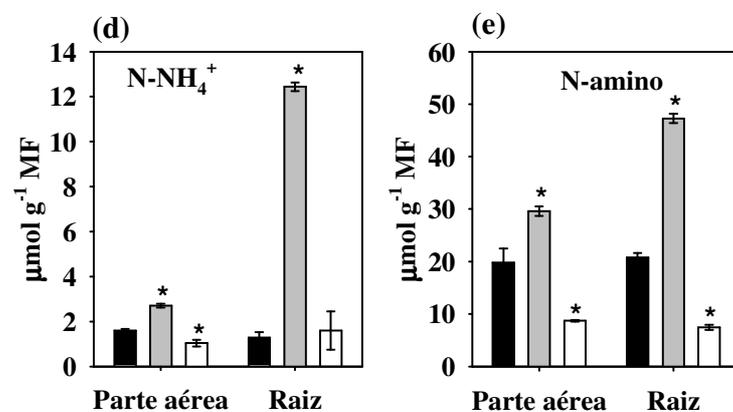
No experimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, houve maiores teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes das plantas submetidas ao ressuprimento (Figura 6a), indicando redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nesse tecido. O mesmo foi observado para a parte aérea, uma vez que parte do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> pode ser enviado para a parte aérea para posterior redução e assimilação (Figura 6a). Os níveis de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas plantas submetidas ao período de três dias de deficiência são inferiores aos teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> das plantas com suprimento constante (Figura 6c), sugerindo um intenso processo de remobilização neste período. Curiosamente, o período de deficiência de três dias no experimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, também resultou em maiores atividades das PM H<sup>+</sup>-ATPases (Figura 3a), sugerindo a participação destas bombas de prótons no fluxo interno do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> oriundo do processo de remobilização. SONDERGAARD et al. (2004) sugerem que a energia necessária para a redistribuição dos nutrientes no interior da planta, é fornecida pelas PM H<sup>+</sup>-ATPases.

No experimento com NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, as plantas submetidas ao ressuprimento deste nutriente apresentaram aumento de, aproximadamente, 12 vezes nos teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes em relação às plantas com suprimento constante de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, enquanto que na parte aérea o aumento foi de apenas 1,5 vezes (Figura 6d). Houve também maior teor de N-amino livre nas raízes em relação à parte aérea (Figura 6e), demonstrando serem as raízes o local preferencial para assimilação do N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em arroz. Os níveis de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> das raízes e parte aérea das plantas supridas constantemente com este nutriente foram inferiores aos das plantas submetidas ao ressuprimento (Figura 6d).

Experimento com  $\text{N-NO}_3^-$



Experimento com  $\text{N-NH}_4^+$



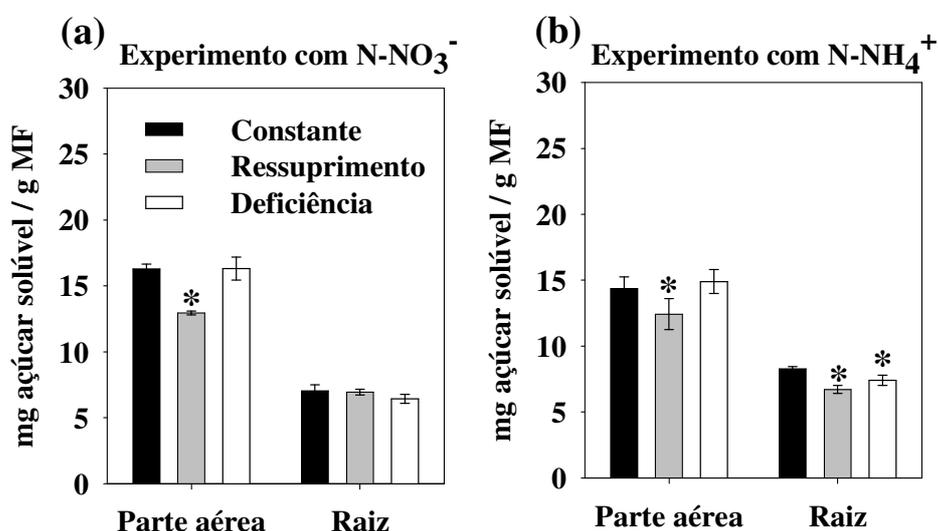
**Figura 6.** Teores de  $\text{N-NH}_4^+$  (a e d), N-amino livre (b e e) e  $\text{N-NO}_3^-$  (c) (as plantas cultivadas com  $\text{N-NH}_4^+$  não apresentaram  $\text{N-NO}_3^-$  em tecido) nas plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  (a, b e c) ou  $\text{NH}_4^+$  (d e e) sob suprimento constante de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  ou deficiência por 75 horas de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de  $\text{N-NO}_3^-$  ou  $\text{N-NH}_4^+$  (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.

Comparativamente, os níveis de N-amino livre sofreram maiores reduções no experimento com deficiência de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 6e) do que no experimento com deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 6b), e isso pode ser decorrente da remobilização do  $\text{NO}_3^-$  no experimento com este nutriente. O teor de  $\text{N-NO}_3^-$  na parte aérea foi igual entre o ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  e deficiência desse nutriente (Figura 6c), enquanto que os teores de  $\text{N-NH}_4^+$  aumentaram com o ressuprimento (Figura 6a), indicando que provavelmente todo o  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea está sendo assimilado.

As plantas sob ressuprimento e deficiência de  $\text{NO}_3^-$  por três dias apresentaram teores similares de  $\text{N-NO}_3^-$  na parte aérea (Figura 6c). SANTOS et al (2009) mostraram que plantas de arroz cultivadas durante 30 dias sob 2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  apresentaram intensa remobilização do  $\text{NO}_3^-$  acumulado nos vacúolos das folhas depois da retirada do  $\text{NO}_3^-$  da solução nutritiva, apresentando uma redução de 73,4% após 72h. A energia necessária para redistribuição de  $\text{NO}_3^-$  é proveniente das PM  $\text{H}^+$ -ATPases (SONDERGAARD et al., 2004), justificando a maior expressão e atividade das PM  $\text{H}^+$ -ATPases na parte aérea das plantas após 75 horas de

deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 3a e b, respectivamente). Na parte aérea das plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  não foram observadas variações significativas na atividade das PM  $\text{H}^+$ -ATPases entre os tratamentos (Figura 3b). Apenas a isoforma *OsAI* foi induzida pelo ressuprimento e deficiência de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 3d). O fato de o  $\text{NH}_4^+$  não ser acumulado nos vacúolos (JAMPEETONG & BRIX, 2009), pode em parte explicar esse comportamento distinto entre os experimentos com  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ .

A absorção de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  demandam proveniente do ATP, que é hidrolisado ( $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$ ) pelas PM  $\text{H}^+$ -ATPases para o bombeamento de  $\text{H}^+$  (GLASS, 2003). O ATP é produzido pela glicólise e ciclo de Krebs, sendo os teores de açúcares solúveis o pool energético para gerar ATP na célula (SOUZA et al., 1998). Nas plantas cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  não houve variações nos teores de açúcares nas raízes, enquanto que na parte aérea as plantas sob ressuprimento apresentaram redução nos teores de açúcares solúveis (Figura 7a). Nas plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$  houve redução nos teores de açúcares solúveis no ressuprimento e deficiência nas raízes, enquanto na parte aérea houve redução somente nas plantas sob ressuprimento (Figura 7b).



**Figura 7.** Teores de açúcares solúveis nas plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  (a) ou  $\text{NH}_4^+$  (b) sob suprimento constante de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ , ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  ou deficiência por 75 horas de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$ . Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N- $\text{NO}_3^-$  ou N- $\text{NH}_4^+$  (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.

Mesmo com maior influxo no ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 4) e atividade da PM  $\text{H}^+$ -ATPase (Figura 5a) os teores de açúcares não diminuíram nas raízes, no entanto, houve redução dos açúcares na parte aérea (Figura 7a). Carboidratos são transportados da parte aérea para a raiz, sendo um mecanismo de controle da absorção de  $\text{NO}_3^-$  (GIRIM et al., 2007), explicando a redução dos teores de açúcares na parte aérea das plantas sob ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$ . O mesmo é observado na parte aérea das plantas cultivadas com  $\text{NH}_4^+$ , no entanto, nas raízes houve redução dos teores de açúcares solúveis no ressuprimento e deficiência de  $\text{NH}_4^+$ . A diferença nos teores de açúcares solúveis nas raízes pode ser proveniente da maior atividade das PM  $\text{H}^+$ -ATPases no ressuprimento e deficiência de  $\text{NH}_4^+$  em relação às plantas

cultivadas com  $\text{NO}_3^-$  (Figura 5). A maior atividade da PM  $\text{H}^+$ -ATPase quando do ressuprimento de  $\text{NH}_4^+$  está relacionada com a maior absorção desse nutriente (Figura 4). O  $\text{NH}_4^+$  absorvido não pode ser translocado para a parte aérea, devendo ser imediatamente assimilado em esqueletos de carbono para evitar toxidez nas células (JAMPEETONG & BRIX, 2009), explicando os altos teores de N-amino livre (Figura 6e) que demandam energia e esqueletos de carbono (FERNANDES & SOUZA, 2006).

Foi avaliada a expressão de três transportadores de  $\text{NO}_3^-$  (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*) e três transportadores de  $\text{NH}_4^+$  (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) por PCR em tempo real, a fim de verificar o efeito da nutrição nítrica ou amoniacal, bem como da deficiência e ressuprimento destes nutrientes sobre a expressão desses genes. Tem sido relatado que estes transportadores são importantes para a absorção de  $\text{NO}_3^-$  (ARAKI & HASEGAWA, 2006) e  $\text{NH}_4^+$  em plantas de arroz (SONODA et al., 2003). Os transportadores de  $\text{NO}_3^-$  *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* apresentaram alta indução com o ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea e raiz, sendo esta indução de aproximadamente 13 vezes na parte aérea e 25 vezes nas raízes (Figura 8a e b). O *OsNRT1.1* apresentou indução somente na parte aérea com o ressuprimento e deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (Figura 8b).

Nas raízes, todos os transportadores de  $\text{NH}_4^+$  apresentaram repressão com o ressuprimento desse íon e alta indução sob deficiência de  $\text{NH}_4^+$ , sendo *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* os mais induzidos na deficiência (cerca de 32 e 15 vezes, respectivamente) (Figura 8c). *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* na parte aérea não apresentaram mudança de expressão entre os tratamentos, enquanto não foi detectada a expressão de *OsAMT1.3* na parte aérea (Figura 8d).

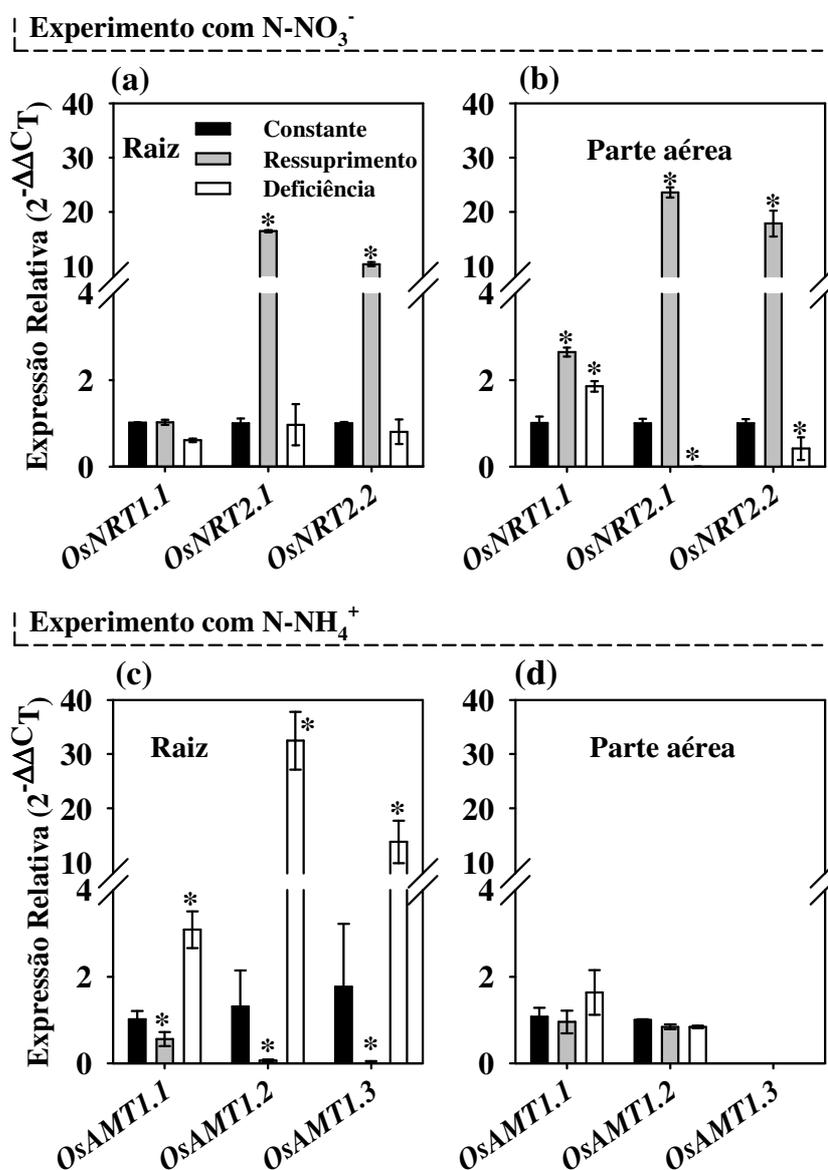
A indução das isoformas *OsA2*, *OsA5*, *OsA7* e *OsA8* nas raízes após três horas de ressuprimento com  $\text{NO}_3^-$  ocorreu concomitante a uma alta indução de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (Figuras 1a e 5a, respectivamente). A indução simultânea das isoformas de *MHA3* e *MHA4* e *ZmNRT2.1* também foi verificada em milho (SANTI et al., 2003). Foi observada alta indução de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* na parte aérea (Figura 8b), indicando uma possível participação desses genes no transporte de  $\text{NO}_3^-$  na parte aérea, embora tenha sido sugerido que *OsNRT2.1* é um gene específico de raiz (ARAKI & HASEGAWA, 2006).

Os transportadores de  $\text{NH}_4^+$  analisados (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) sofreram repressão nas raízes com o ressuprimento de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 8c), provocado provavelmente pelo alto influxo e assimilação de  $\text{NH}_4^+$ , gerando altos teores de N-amino livre nas raízes (Figura 6e) que reprimem a expressão dos transportadores responsáveis pela absorção de  $\text{NH}_4^+$  (SONODA et al., 2003).

As plantas com deficiência de  $\text{NH}_4^+$  por três dias apresentaram alta expressão de *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* nas raízes (Figura 8c), resultado possivelmente do decréscimo dos teores de N- $\text{NH}_4^+$  e N-amino livre nas raízes (Figura 6d e 6e). Nossos resultados mostram que *OsAMT1.1* apresenta padrão de expressão similar à *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* nas raízes (Figura 8c), enquanto os de LI et al. (2006) mostram expressão constitutiva de *OsAMT1.1* em arroz.

Os transportadores de  $\text{NH}_4^+$  *OsAMT1.1* e *OsAMT1.2* não apresentaram diferenças de expressão entre os tratamentos na parte aérea (Figura 8d), mostrando que esses genes não sofreram alteração de expressão com o ressuprimento ou deficiência de  $\text{NH}_4^+$ . SONODA et al. (2003) não verificaram a expressão de *OsAMT1.2* na parte aérea. Foi observado que a manutenção das plantas por um período de três dias de deficiência de N- $\text{NH}_4^+$  induz a expressão do *OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3* nas raízes, mas que em apenas três horas de exposição a uma solução contendo 2mM de N- $\text{NH}_4^+$  os níveis de expressão desses mesmos transportadores são extremamente reduzidos (Figura 8c), indicando uma rápida absorção e assimilação após o ressuprimento (Figura 4). Três horas após o ressuprimento com N- $\text{NH}_4^+$ , o teor deste nutriente nas raízes ainda está bem elevado (Figura 6d), justificando em parte a

manutenção de valores mais elevados de atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases nas raízes comparado ao tratamento controle (Figura 5).



**Figura 8.** Expressão relativa de três transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (*OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e três transportadores de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (*OsAMT1.1*, *OsAMT1.2* e *OsAMT1.3*) em raízes (a e c) e parte aérea (b e d) de arroz da variedade Nipponbare em experimentos com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (a e b) ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (c e d) sob suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou deficiência por 75 horas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. O tratamento controle (2 mM constante com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foi assumido como tratamento de referência. Os tratamentos com ressuprimento e deficiência de N sob asterisco diferem significativamente do tratamento controle com suprimento constante de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Teste de Tukey, p<0,05). As barras representam médias ± SE (erro padrão) de três repetições.

Os resultados obtidos sugerem o controle transcricional que o ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> exerce sobre as PM H<sup>+</sup>-ATPases. O aumento observado na atividade dessa

enzima com  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  envolve diferentes isoformas das subfamílias I e II. Os resultados indicam a importância de considerar a expressão de diferentes isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases quando se usa  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  em estudos de absorção de N por plantas. Estudos futuros usando mutantes poderão revelar melhor a importância de isoformas específicas na absorção de N. A isoforma *OsA2* desperta interesse especial por ser altamente induzida pelo ressurgimento de  $\text{NO}_3^-$  na raiz e parte aérea, assim como *OsA7* que foi induzida por  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$ . Possivelmente as isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases *OsA2* e *OsA7* são genes candidatos à afetar substancialmente a eficiência de absorção de N em arroz.

#### **4.2. Efeito do Ressurgimento e Deficiência de $\text{NO}_3^-$ sobre a Expressão e Atividade da PM $\text{H}^+$ -ATPase, Transportadores de $\text{NO}_3^-$ e Proteínas NAR em Raízes das Variedades de Arroz Piauí e IAC-47 - Experimento II**

Os dois principais componentes diretamente envolvidos na absorção de  $\text{NO}_3^-$  são as PM  $\text{H}^+$ -ATPases e os transportadores de  $\text{NO}_3^-$ . Esses componentes precisam estar coordenados com a disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no meio para uma absorção mais eficiente. A resposta transcricional das plantas à disponibilidade diferencial de  $\text{NO}_3^-$  pode ser um mecanismo chave para a sobrevivência em ambientes pobres em nutrientes, através da regulação de genes específicos para a absorção de nutrientes como transportadores de  $\text{NO}_3^-$  e PM  $\text{H}^+$ -ATPase (ARAKI & HASEGAWA, 2006; SANTI et al., 2003). Nesse estudo, utilizamos plantas de arroz contrastantes quanto à eficiência de uso de N, a fim de verificar a absorção de  $\text{NO}_3^-$  e a expressão de genes relacionados com esse processo. A variedade de arroz Piauí adaptada a condições de baixa disponibilidade de nutrientes e fluxo sazonal de  $\text{NO}_3^-$  e a variedade de arroz IAC-47 desenvolvida para cultivos com aporte de nutrientes via fertilização (SOUZA et al., 1998).

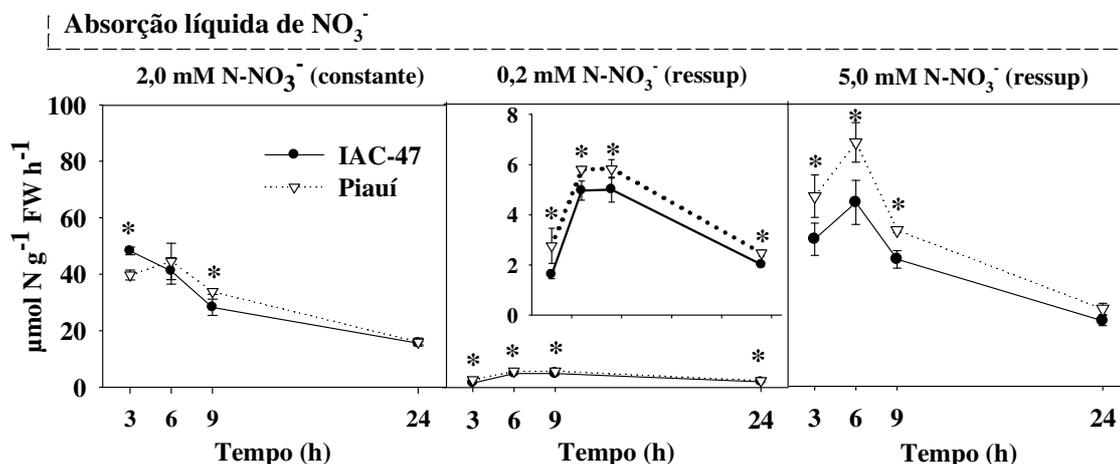
Para verificar as diferenças de absorção de  $\text{NO}_3^-$  entre as variedades de arroz IAC-47 (melhorada) e Piauí (tradicional), primeiramente foi avaliado o influxo aparente de  $\text{NO}_3^-$  em três condições distintas: cultivo sob suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ , ressurgimento com 0,2 mM de N- $\text{NO}_3^-$  (baixa dose) e ressurgimento com 5,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$  (alta dose). As plantas sob ressurgimentos com baixa ou alta dose de N- $\text{NO}_3^-$  (0,2 e 5,0 mM) apresentaram comportamento distinto em comparação ao suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$  (Figura 9). Enquanto no tratamento com ressurgimento de  $\text{NO}_3^-$  foi observado aumento de influxo entre os tempos 3 e 6 horas e redução no tempo 24 horas, o mesmo não foi observado no tratamento com suprimento constante de 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ .

A variedade Piauí apresentou maior influxo aparente de  $\text{NO}_3^-$  em relação à variedade IAC-47 com ressurgimento de 0,2 mM de N-  $\text{NO}_3^-$  em todos os tempos analisados (Figura 9). No ressurgimento com 5,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ , a variedade Piauí mostrou maior influxo aparente nos tempos 3, 6 e 9 horas. Esse comportamento revela que, de fato, a variedade Piauí é mais adaptada aos fluxos sazonais de  $\text{NO}_3^-$ , nesse caso, simulado pelo ressurgimento.

O aumento da taxa de absorção no tempo 6 horas nos ressurgimentos com 0,2 e 5,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$  não foi observado quando do suprimento constante (Figura 9), indicando alto influxo de  $\text{NO}_3^-$  em plantas deficientes de N. LIU et al. (2009) e SANTI et al. (2003) verificaram em milho que os maiores valores de influxo de  $\text{NO}_3^-$  ocorreram 2 e 4 horas após o início da indução com  $\text{NO}_3^-$ , respectivamente.

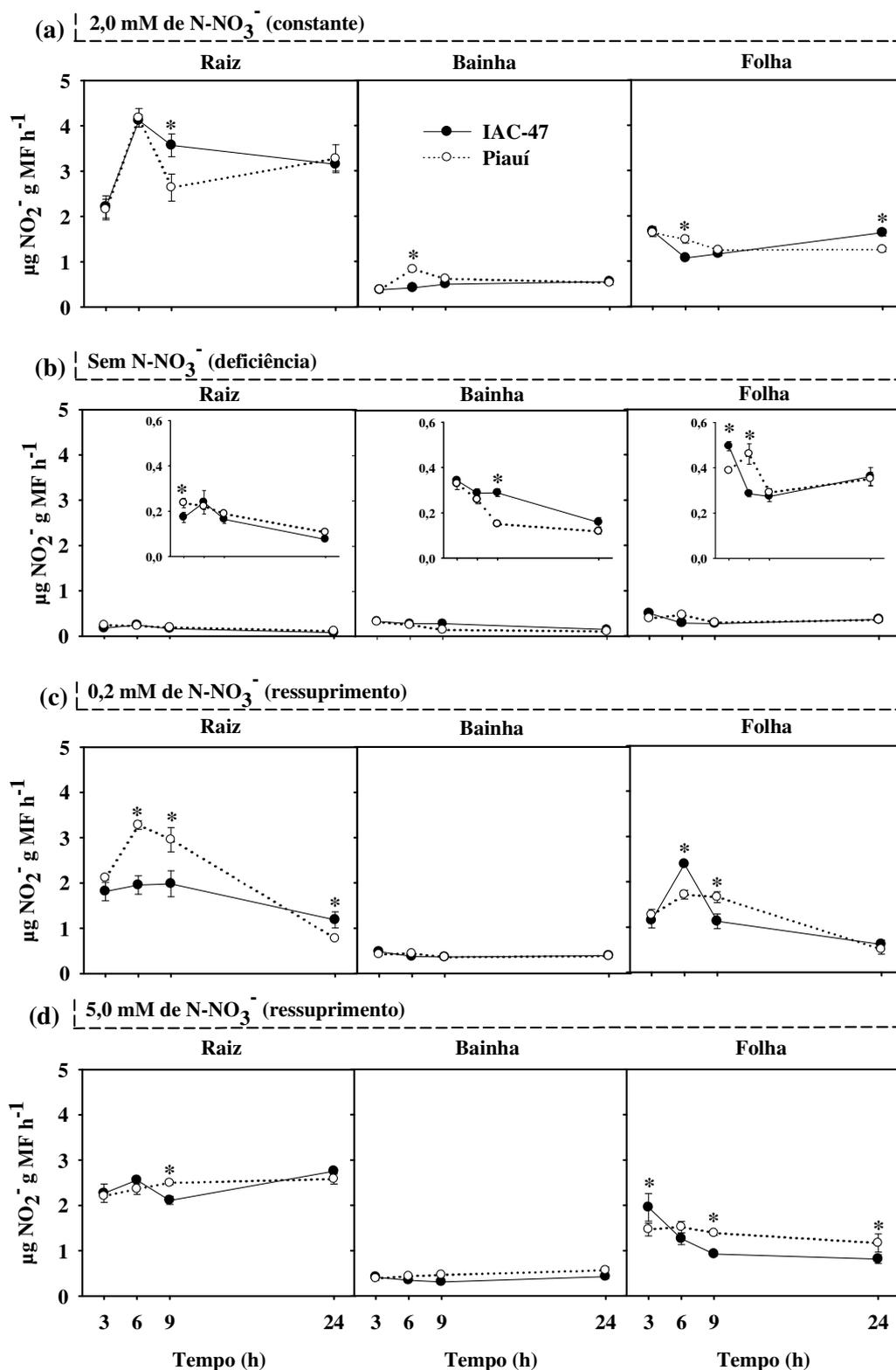
Como pode ser observado na Figura 10, a atividade da Nitrato Redutase (ANR) foi diferente entre as partes da planta. De modo geral, as bainhas apresentaram menor ANR enquanto as raízes e folhas apresentaram maior ANR. As plantas de ambas as variedades com suprimento constante de N- $\text{NO}_3^-$  apresentaram pico de ANR no tempo 6 horas nas raízes enquanto nas folhas e bainhas a ANR foi constante (Figura 10a). Na deficiência de N- $\text{NO}_3^-$  as folhas apresentaram maior ANR (Figura 10b), sugerindo que parte do  $\text{NO}_3^-$  acumulado está sendo assimilado principalmente na parte aérea. No ressurgimento com 0,2 mM de N-  $\text{NO}_3^-$  a

variedade Piauí apresentou maior ANR nas raízes nos tempos 6 e 9 horas, enquanto nas folhas a variedade IAC-47 apresentou maior atividade no tempo 6 horas após o ressuprimento (Figura 10c). No ressuprimento com 5,0 mM de N-  $\text{NO}_3^-$  a variedade IAC-47 apresentou maior ANR nas folhas no tempo 3 horas, enquanto nos tempos 9 e 24 horas a variedade Piauí apresentou maior ANR (Figura 10d).

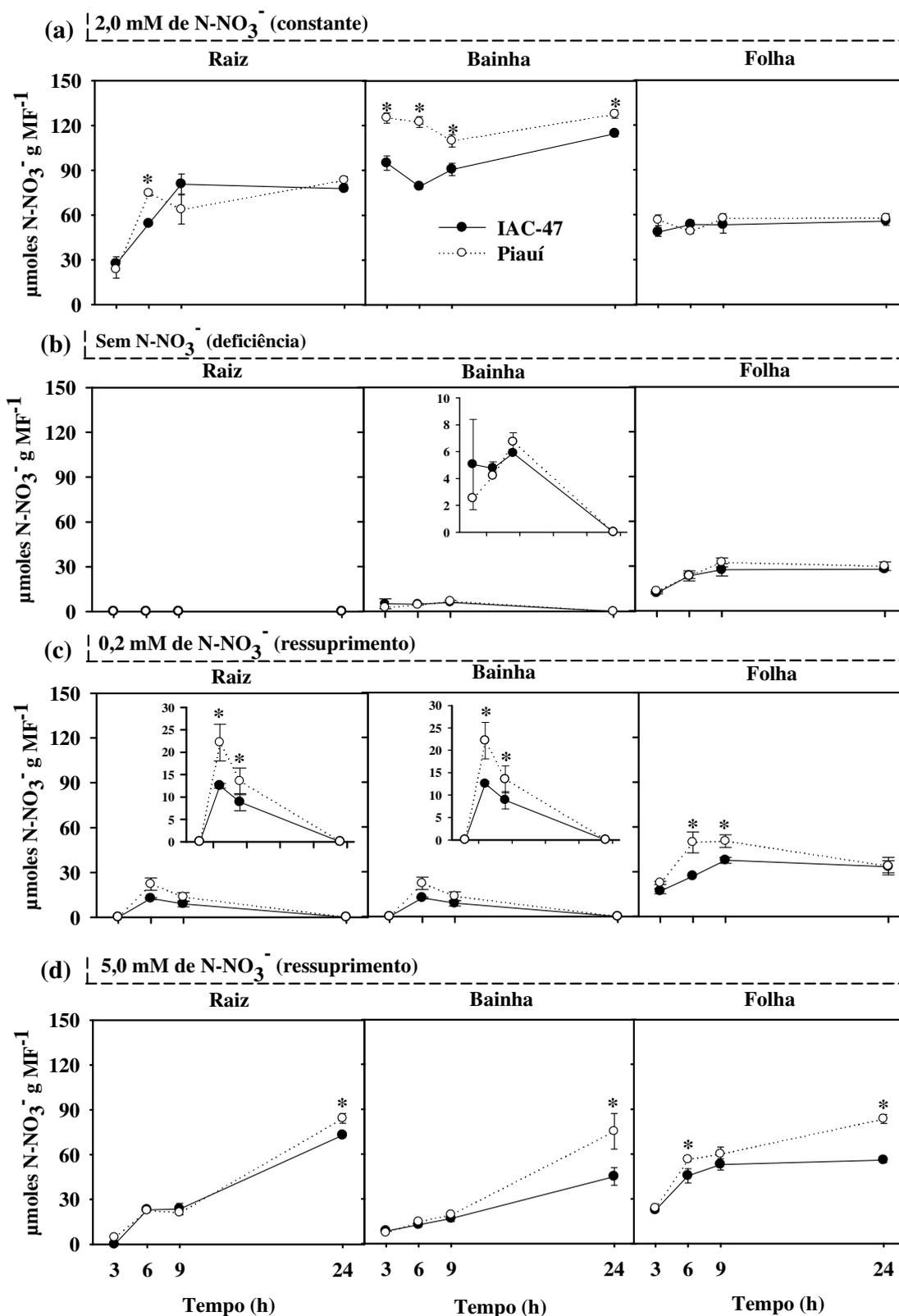


**Figura 9.** Influxo aparente de  $\text{NO}_3^-$  nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí sob ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.

A variedade Piauí mostrou maiores níveis de N- $\text{NO}_3^-$  em tecido, mesmo nas plantas com ressuprimento de N- $\text{NO}_3^-$  (Figura 11). Nas plantas supridas constantemente com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$  os maiores teores de N- $\text{NO}_3^-$  foram nas bainhas, onde a variedade Piauí mostrou maior acúmulo de N- $\text{NO}_3^-$  (Figura 11a). A deficiência de N- $\text{NO}_3^-$  por três dias consumiu todo o  $\text{NO}_3^-$  acumulado nas raízes, enquanto nas folhas os teores foram superiores a 25  $\mu\text{mol N-NO}_3^- \text{g MF}^{-1}$ , indicando que em condições de deficiência de  $\text{NO}_3^-$  a folha representa importante dreno de N de outras partes da planta para manutenção da homeostase do metabolismo de N (Figura 11b).



**Figura 10.** Atividade da Nitrato Redutase (ANR) em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.



**Figura 11.** Teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (sem N), ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições.

A variedade Piauí apresentou maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  com ressuprimento de 0,2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  nos tempos 6 e 9 horas após o ressuprimento em todas as partes analisadas (Figura 11c), enquanto no ressuprimento com 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  a variedade Piauí apresentou maiores teores de  $\text{N-NO}_3^-$  no tempo 24 horas em todas as partes analisadas (Figura 11d).

O maior acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  na variedade Piauí durante o período de crescimento vegetativo, é um indicativo de eficiência de uso de N por essa variedade de arroz. Resultados semelhantes foram anteriormente descritos por SOUZA et al. (1998) em arroz, KANT et al. (2008) em Arabidopsis e HIREL et al (2003) em milho. Esses autores sugerem que plantas sob condições limitantes de N, o acúmulo de  $\text{NO}_3^-$  durante o período inicial de desenvolvimento da planta é uma importante característica estratégica para o desenvolvimento vegetal durante a fase reprodutiva. Quando alta dose de  $\text{NO}_3^-$  é fornecida às plantas, como no caso do ressuprimento com 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ , parte do N pode ser acumulado nos vacúolos, sendo transportado para essa organela através de um antiporte de  $\text{NO}_3^-$  (DE ANGELI et al., 2006) e do gradiente de potencial eletroquímico gerado pelas  $\text{V-H}^+$ -ATPases e  $\text{H}^+$ -PPases (KREBS et al., 2010).

O acúmulo de  $\text{N-NO}_3^-$  durante o período vegetativo como observado na variedade Piauí é uma importante característica para a eficiência de uso de N, que pode ser remobilizado nos períodos de deficiência de N e amenizar os efeitos negativos da falta desse nutriente (GLASS, 2009). Da mesma forma que o período de deficiência resultou em menor relação raiz/parte aérea (raiz/PA) na variedade Nipponbare (Tabela 2), o mesmo foi observado para as variedades IAC-47 e Piauí (Tabela 3).

**Tabela 3.** Massa fresca (g/6 plantas) e razão raiz:parte aérea das plantas de arroz da variedade Piauí e IAC-47 cultivadas durante dezenove dias em câmara de crescimento em solução contendo 2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  de modo constante, com ressuprimento 0,2 ou 5 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  ou após 72 horas de deficiência e com deficiência de N durante 96 horas.

Variedade IAC-47				
	Massa fresca total	Parte aérea (PA)	Raiz	Razão
Tratamento	Massa (g/6 plantas)	Massa (g/6 plantas)	Massa (g/6 plantas)	raiz:PA
2,0 mM $\text{NO}_3^-$ const	8,20b <sup>a</sup>	5,02a	3,18b	0,60b
Sem $\text{N-NO}_3^-$ (defic)	7,46b	4,29b	3,78a	0,73a
0,2 mM $\text{NO}_3^-$ ressop	7,55b	4,45b	3,10b	0,69a
5,0 mM $\text{NO}_3^-$ ressop	7,80b	5,63a	3,79a	0,63b
Variedade Piauí				
	Massa fresca total	Parte aérea (PA)	Raiz	Razão
Tratamento	Massa (g/6 plantas)	Massa (g/6 plantas)	Massa (g/6 plantas)	raiz:PA
2,0 mM $\text{NO}_3^-$ const	8,75a	5,49a	3,25a	0,59b
Sem $\text{N-NO}_3^-$ (defic)	6,71b	3,85b	2,91b	0,74a
0,2 mM $\text{NO}_3^-$ ressop	7,65b	4,53b	3,11a	0,69a
5,0 mM $\text{NO}_3^-$ ressop	6,95b	4,12b	2,84b	0,68a

<sup>a</sup> Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). O asterisco representa maior massa fresca em relação à outra variedade com mesmo tratamento na parte da planta.

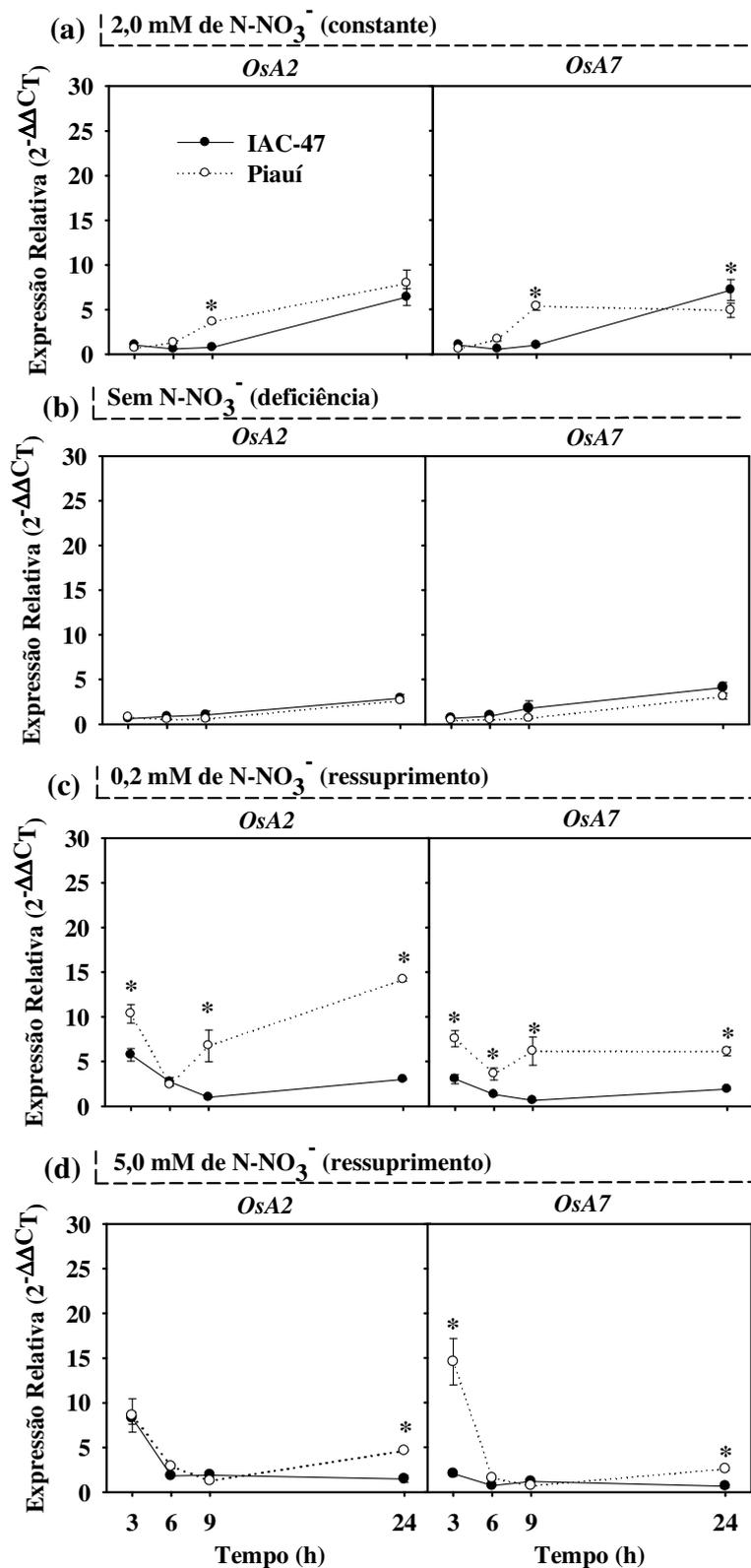
Não houve diferenças entre variedades na razão raiz/PA, com exceção do ressuprimento com 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> onde a variedade Piauí apresentou maior relação raiz/PA. No tratamento com 2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> constante, a variedade Piauí apresentou maior massa fresca total em relação à variedade IAC-47, decorrente do maior crescimento da parte aérea. Já na deficiência de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a variedade IAC-47 apresentou maior crescimento que a variedade Piauí. É interessante notar que a variedade Piauí mesmo apresentando menor crescimento radicular no tratamento com ressuprimento de 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Tabela 3) apresentou maior taxa de absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> que a variedade de arroz IAC-47.

Para avaliar o efeito do ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sob a expressão da PM H<sup>+</sup>-ATPase, foram avaliadas por PCR em tempo real as isoformas *OsA2* e *OsA7*. Esses genes são importantes para a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por arroz por serem os mais induzidos pelo ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 3) e apresentarem o maior número de ESTs entre as isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases em arroz (Tabela anexa 1). Nas plantas com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, as expressões dos genes *OsA2* e *OsA7* aumentaram no tempo 9 horas (três e cinco vezes na variedade Piauí, respectivamente), enquanto nas raízes das plantas sob deficiência de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a expressão de *OsA2* e *OsA7* aumentou cerca de três vezes no tempo 24 horas (Figura 12a e b). No ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no tempo 3 horas, *OsA2* apresentou indução de dez vezes na variedade Piauí e cinco vezes na IAC-47, enquanto *OsA7* foi induzida sete vezes na Piauí e três vezes e meia na IAC-47 (Figura 12c). No ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> as variedades apresentaram diferenças marcantes na expressão, sendo que nos tempos 9 e 24 horas a variedade Piauí mostrou forte aumento de expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* (aumento de 14 e seis vezes, respectivamente, no tempo 24 horas), enquanto na variedade IAC-47 houve indução quatro vezes menor de *OsA2* e duas vezes menor de *OsA7* no tempo 24 horas (Figura 12c). Esses resultados estão de acordo com os maiores valores de influxo observados na variedade Piauí sob baixo suprimento de N (Figura 12).

Curiosamente, as plantas com ressuprimento de 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram diferenças no padrão de expressão de *OsA2* e *OsA7* em comparação ao ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 12d). No tempo 3 horas o gene *OsA2* apresentou aumento de expressão de oito vezes em ambas as variedades, seguido de redução nos tempos 6 e 9 horas e aumento de quatro vezes no tempo 24 horas apenas na variedade Piauí (Figura 12d).

No ressuprimento com 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a variedade IAC-47 apresentou aumento de expressão de duas vezes de *OsA7* e manteve constante nos outros tempos, enquanto a variedade Piauí apresentou aumento de expressão de *OsA7* de 14 vezes no tempo 3 horas e reduziu nos outros tempos (Figura 12d).

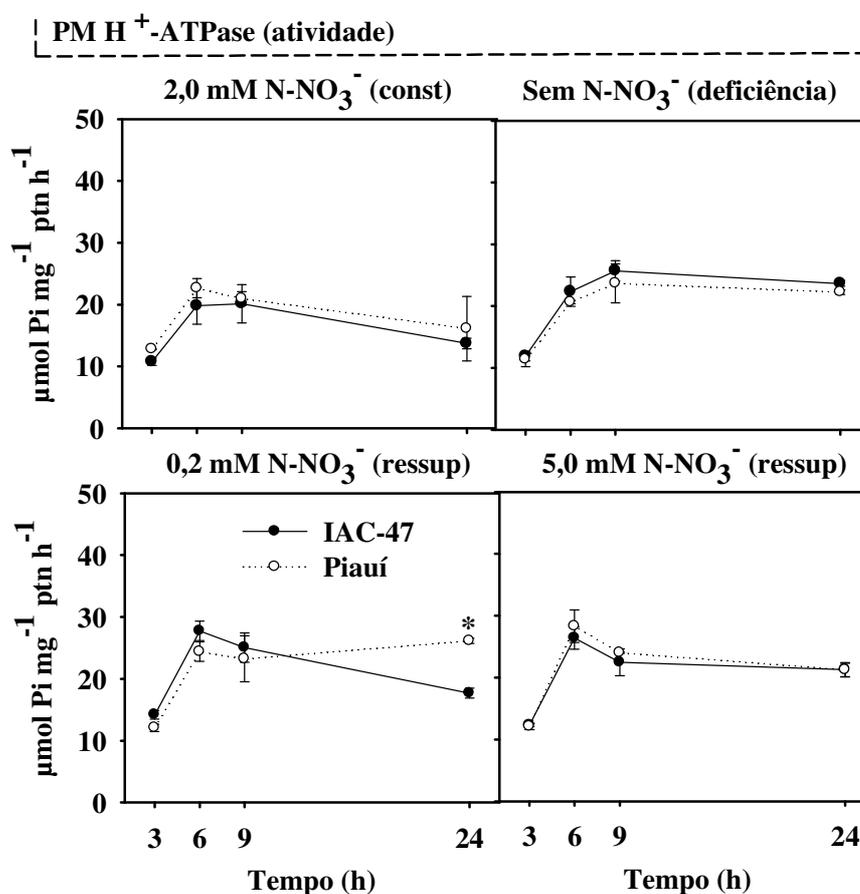
Apesar do aumento de expressão de *OsA2* e *OsA7* após 3 horas do ressuprimento de 0,2 ou 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o aumento de atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase ocorreu somente 6 horas após o ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 13). SANTI et al. (2003) verificaram que o pico de expressão de duas isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases (*MHA3* e *MHA4*) ocorria 3 horas após o suprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, enquanto o pico de atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase ocorria 8 horas após o ressuprimento. A diferença entre o tempo de indução e atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase pode ser decorrente do intervalo entre a expressão, tradução e endereçamento das enzimas para a membrana plasmática.



**Figura 12.** Expressão das isoformas de PM  $\text{H}^+$ -ATPases da PM  $\text{H}^+$ -ATPase *OsA2* e *OsA7* em plantas de arroz das variedades IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.

As plantas cultivadas sem  $\text{NO}_3^-$  ou com suprimento constante de 2,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  também mostraram aumento de atividade no tempo 6 horas (menor em relação ao ressuprimento com 0,2 ou 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ ), no entanto, *OsA2* e *OsA7* não aumentaram de expressão no tempo 3 horas.

Apesar das diferenças de expressão de *OsA2* e *OsA7* entre IAC-47 e Piauí, a atividade de  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$  não apresentou mesmo comportamento. Não houve diferenças na atividade da  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$  entre os tratamentos no tempo 3 horas, no entanto, no tempo 6 horas a atividade da  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$  foi maior nos tratamentos com ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$ , que apresentou atividade 92% maior em relação ao tempo 3 horas (Figura 13). Nos tempos 9 e 24 horas a atividade da  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$  permaneceu constante em relação ao tempo 6 horas nos tratamentos sem  $\text{N-NO}_3^-$ , suprimento constante e ressuprimento com 0,2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ , enquanto com ressuprimento de 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  houve redução de atividade nos tempos 9 e 24 horas.



**Figura 13.** Atividade da  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$  em plantas de arroz das variedades IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.

O aumento do influxo de  $\text{NO}_3^-$  no tempo 6 horas quando do ressuprimento com 0,2 ou 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  também coincidiu com o aumento da atividade da  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$ . Curiosamente, a atividade da  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$  no tempo 6 horas foi semelhante no ressuprimento de 0,2 e 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ , mesmo com diferença de mais de 14 vezes no influxo de  $\text{NO}_3^-$  entre esses tratamentos. Esse resultado pode ser explicado pelo fato que 0,2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  ser uma dose baixa que pode ainda permitir a ativação das  $\text{PM H}^+\text{-ATPase}$

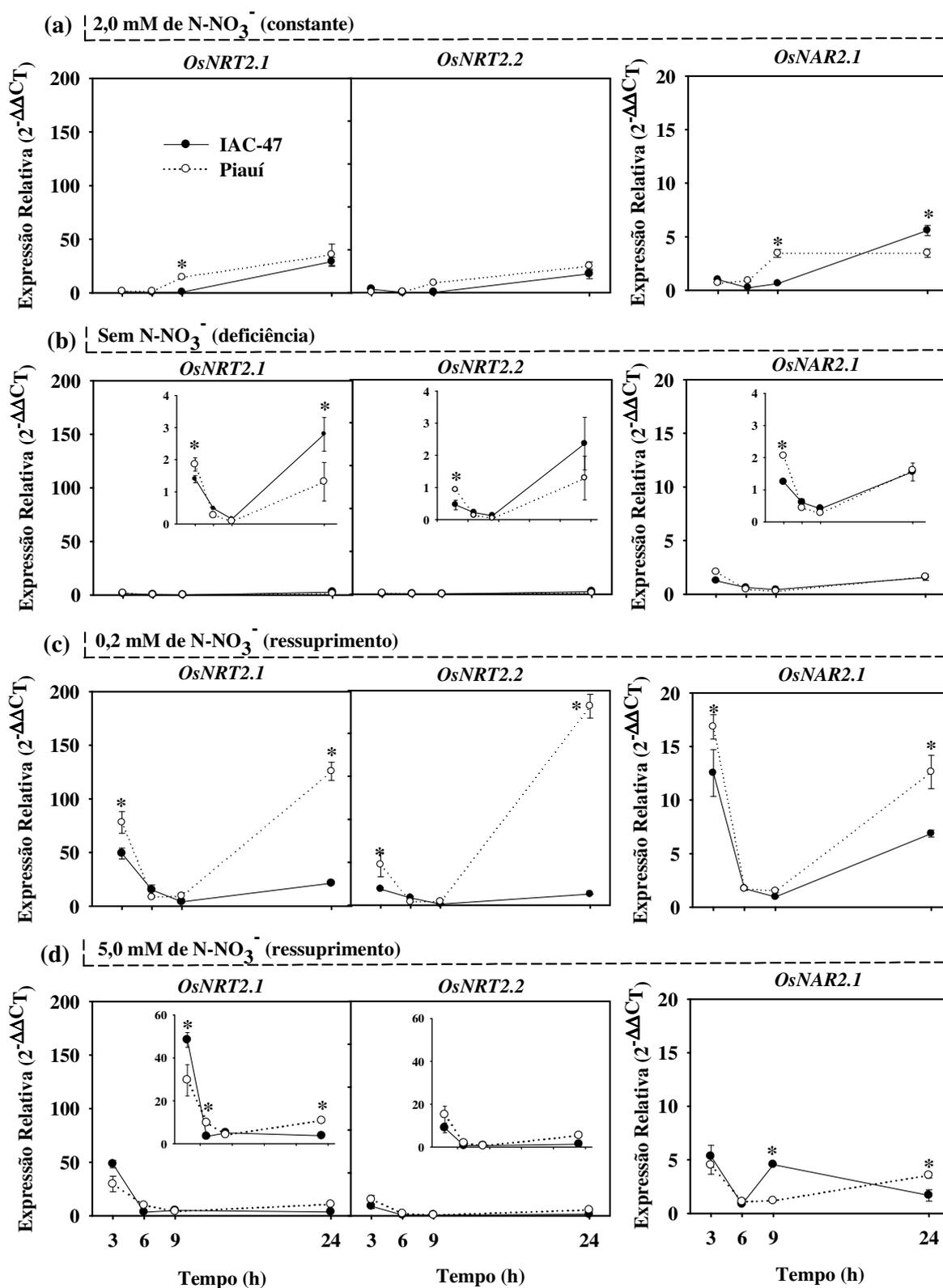
para o crescimento radicular em resposta ao baixo suprimento de N, como observado nas raízes das plantas sem N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (deficiência) dos experimentos I e II (Figuras 3 e 11).

O tratamento com suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentou a menor atividade entre os tratamentos. Curiosamente, a atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase foi semelhante entre os tratamentos com ressuprimento de 0,2 e 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, mesmo com diferença no influxo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> entre os dois tratamentos de mais de 14 vezes (Figura 9). A maior atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase na variedade Piauí em relação à variedade IAC-47 no tratamento 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> no tempo 24 horas e não no ressuprimento com 5,0 mM pode ser atribuído a dois fatores: (i) a variedade Piauí possui melhor adaptação à ambientes com baixa disponibilidade de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e mantém maior atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase para favorecer a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (ii) a maior atividade da variedade Piauí pode ser o estímulo para o maior crescimento radicular em ambientes pobres de nutrientes.

SANTOS et al. (2009) verificaram que a variedade Piauí apresentou maior atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase quando comparada com a variedade IAC-47 sob deficiência de N, no entanto, em nossos resultados não foram encontradas diferenças de atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase entre as variedades de arroz nas raízes das plantas sem N por três dias (Figura 13). Possivelmente, a maior expressão dos genes *OsA2* e *OsA7* causada pelo ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> na variedade Piauí levaram à maior atividade dessa enzima após 24 horas do ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, o que não foi observado 24 horas após o ressuprimento com 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 12c e d).

O ressuprimento com 0,2 ou 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> provocou maior expressão e atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase, de acordo com os resultados observados no experimento I (Figuras 1 e 3) e por SANTI et al. (2003). Apesar das diferenças de expressão de *OsA2* e *OsA7* com o ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> entre as variedades de arroz IAC-47 e Piauí (Figura 12), não foram observadas diferenças na atividade das PM H<sup>+</sup>-ATPases entre as variedades, com exceção do tempo 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 13). Apesar da regulação transcricional das PM H<sup>+</sup>-ATPases, GAXIOLA et al. (2007) sugerem que essas enzimas são reguladas principalmente de maneira pós-traducional, explicando a maior expressão de *OsA2* e *OsA7* na variedade Piauí em relação a variedade IAC-47 que não foi convertida em aumento de atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase. O controle pós-traducional das PM H<sup>+</sup>-ATPases ocorre através da fosforilação/desfosforilação do penúltimo resíduo de treonina na região C-terminal, envolvendo também a participação da proteína regulatória 14-3-3.

As PM H<sup>+</sup>-ATPase são enzimas do metabolismo vegetal envolvidas em diversos processos e sua principal função é a manutenção do gradiente de H<sup>+</sup> entre o apoplasto e o citossol durante a absorção de solutos (SONDERGAARD et al., 2004). GEVÁUDANT et al. (2007) verificaram que a atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase *in vivo* pode não corresponder com a atividade *in vitro*. Esses autores sugerem que alguns problemas ocorrem durante a extração das vesículas, como o rompimento da estrutura quaternária que pode afetar a estabilidade e a atividade *in vitro*, além da separação do complexo PM H<sup>+</sup>-ATPase e proteína 14-3-3. Outro fator que poderia afetar a precisão da atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase *in vitro* seria a hidrólise de ATP provocado pelas H<sup>+</sup>-ATPases em vesículas que ainda não fazem parte da membrana plasmática (GEVÁUDANT et al., 2007). As diferenças de expressão de *OsA2* e *OsA7* entre as variedades de arroz IAC-47 e Piauí (Figura 12) e atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase (Figura 13) podem ser explicadas em parte pela limitação do processo de extração das vesículas.



**Figura 14.** Expressão dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$  *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e proteína NAR *OsNAR2.1* em plantas de arroz das variedades IAC-47 e Piauí sob deficiência de  $\text{NO}_3^-$  (sem N), ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$  (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ . Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ . As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.

Em *Nicotiana plumbaginifolia* as principais isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases são *PMA2* e *PMA4*, sendo que análises do *status* de fosforilação dessas duas isoformas em condições normais de crescimento indicam que não mais de 44% (*PMA2*) ou 32% (*PMA4*) estão ativas (BOBIK et al., 2010). O aumento de atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase observada nas raízes de ambas as variedades sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> sem aumento de expressão de *OsA2* e *OsA7* é um forte indicativo da regulação pós-traducional dessa enzima. Apesar de existirem outras oito isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases que não foram avaliadas a expressão nas variedades IAC-47 e Piauí, o experimento I mostra que nenhuma das dez isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases são induzidas pela deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas raízes (Figura 3).

Os principais transportadores envolvidos na absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em baixas concentrações em arroz são *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, juntamente com a proteína ativadora *OsNAR2.1* (ARAKI & HASEGAWA, 2006). A expressão desses genes foi avaliada nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí para verificar se o maior influxo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> está correlacionado com maiores níveis de expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* e como são expressos em diferentes doses de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 14).

Plantas com suprimento constante de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram baixa expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* nos tempos 3 e 6 horas, no entanto, no tempo 24 horas *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* apresentaram aumento de expressão de 34 e 24 vezes, respectivamente (Figura 14a). Piauí apresentou maior expressão de *OsNRT2.1* no tempo 9 horas, enquanto *OsNAR2.1* foi mais expressa na variedade Piauí no tempo 9 horas e maior na variedade IAC-47 no tempo 24 horas (Figura 14a). Os genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* nas plantas sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> foram pouco induzidos e aparentemente apresentaram variação diurna, com maior expressão no tempo 3 horas e decréscimo nos tempos 6 e 9 horas, com posterior aumento no tempo 24 horas (Figura 14b).

A expressão dos transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de alta afinidade está envolvida na absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> quando este nutriente está em baixas concentrações. Os resultados de expressão do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* com ressurgimento de 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> estão de acordo com os trabalhos de ARAKI & HASEGAWA (2006) e ORSEL et al. (2006), apresentando indução de 78 vezes na variedade Piauí e 50 vezes na variedade IAC-47 no tempo 3 horas (Figura 14c). Após a queda de expressão nos tempos 6 e 9 horas em ambas as variedades, a Piauí apresentou aumento de expressão de 125 vezes do *OsNRT2.1* e 185 vezes do *OsNRT2.2* no tempo 24 horas, enquanto IAC-47 apresentou expressão de 21 e 11 vezes do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, respectivamente (Figura 14c).

A expressão do *OsNAR2.1* seguiu o mesmo padrão de expressão, com maior aumento de expressão nos tempos 3 e 24 horas, sendo que a variedade Piauí apresentou maior expressão de *OsNAR2.1* nesses dois tempos em relação à variedade IAC-47 (Figura 14c).

No ressurgimento com 5,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a variedade IAC-47 apresentou indução de 48 vezes do *OsNRT2.1* e Piauí 30 vezes no tempo 3 horas, enquanto *OsNRT2.2* apresentou indução de 13 vezes em ambas as variedades (Figura 14d). Após redução de expressão do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* nos tempos 6 e 9 horas, não houve aumento de expressão no tempo 24 horas.

A indução de expressão do *OsNAR2.1* foi de cinco vezes no tempo 3 horas, contudo, após redução de expressão no tempo 6 horas, a variedade Piauí apresentou maior expressão de *OsNAR2.1* no tempo 9 horas enquanto a variedade IAC-47 apresentou maior expressão desse gene no tempo 24 horas (Figura 14d).

Além da maior expressão de *OsA2* e *OsA7* na variedade Piauí na dose de 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, os transportadores de nitrato de alta afinidade avaliados, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, foram mais expressos na variedade Piauí, que pode ter causado a maior absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por essa variedade (Figura 14c). ARAKI & HASEGAWA (2006) mostraram que *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são rapidamente induzidos após a exposição ao NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e que podem ser genes chave

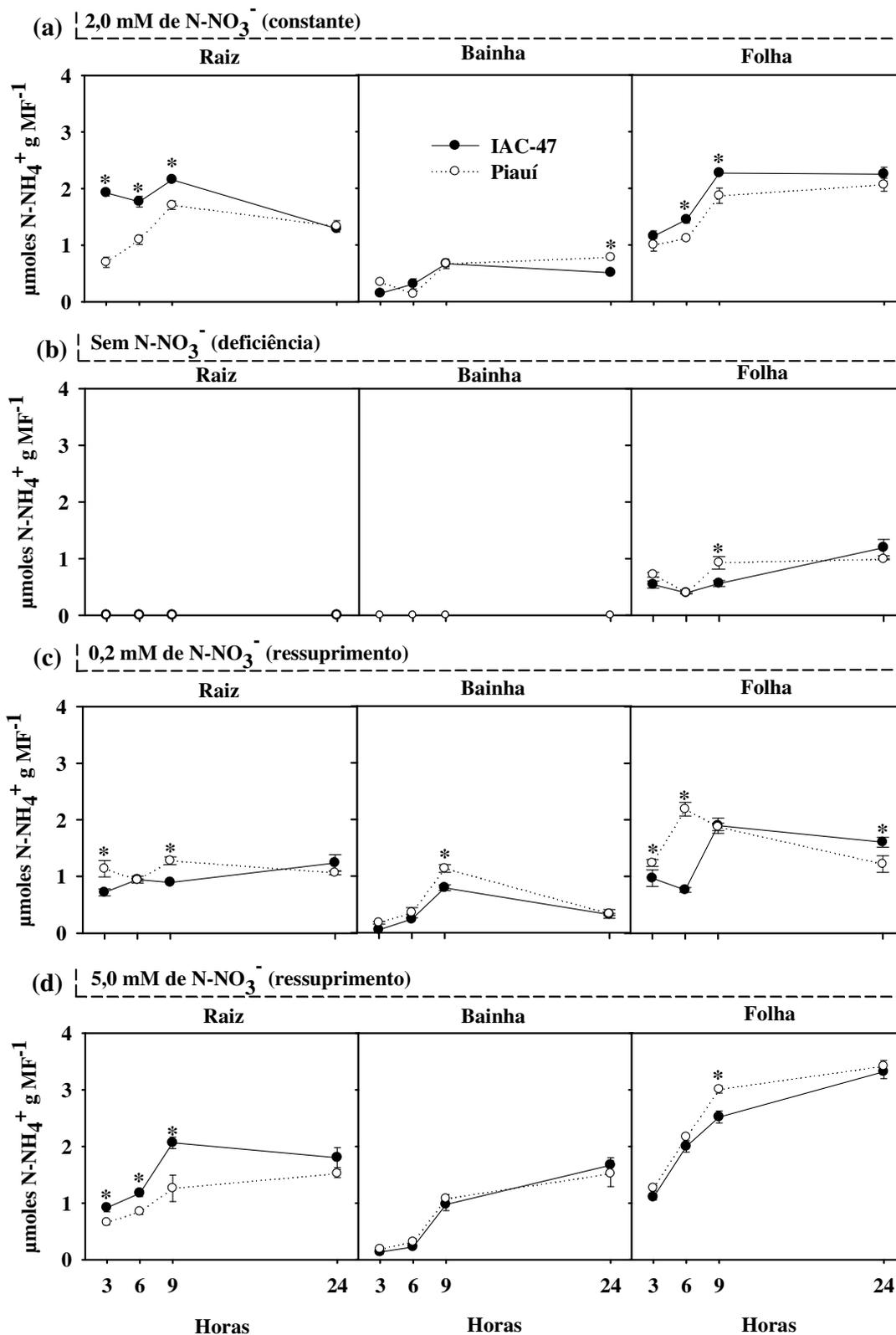
na eficiência de absorção de  $\text{NO}_3^-$  por arroz. A resposta de expressão de transportadores de alta afinidade na variedade Piauí fica mais evidente 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de N- $\text{NO}_3^-$ , apresentando expressão 6 e 17 vezes maior de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* respectivamente, em comparação com a variedade IAC-47 (Figura 14c).

A expressão de *OsNAR2.1* no ressuprimento com 0,2 mM de N- $\text{NO}_3^-$  foi maior na variedade Piauí e apresentou o mesmo padrão de expressão de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, mostrando que a adaptação da variedade de arroz Piauí a ambientes pobres em  $\text{NO}_3^-$  também envolve a proteína NAR. Plantas de *Arabidopsis* mutantes sem a expressão de *AtNAR2.1* (inserção de T-DNA) apresentaram forte redução de crescimento com baixas doses de  $\text{NO}_3^-$ , no entanto, quando cultivadas em meio com alta concentração de  $\text{NO}_3^-$  as plantas mutantes cresceram normalmente (ORSEL et al., 2006). Nossos resultados estão de acordo com ORSEL et al. (2006), pois com ressuprimento de 5,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$  ou suprimento constante com 2,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$  a expressão de *OsNAR2.1* é menor quando comparada às plantas que receberam ressuprimento com 0,2 mM de N- $\text{NO}_3^-$  (Figura 14a e b). Segundo OKAMOTO et al. (2003) a expressão de *NAR2.1* e de *NRT2.1* em *Arabidopsis* são co-regulados, sendo que nossos resultados mostram que a variedade de arroz Piauí apresenta maior expressão desses dois genes. O mesmo padrão de expressão entre *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* foi encontrado em ambas as variedades (Figura 12).

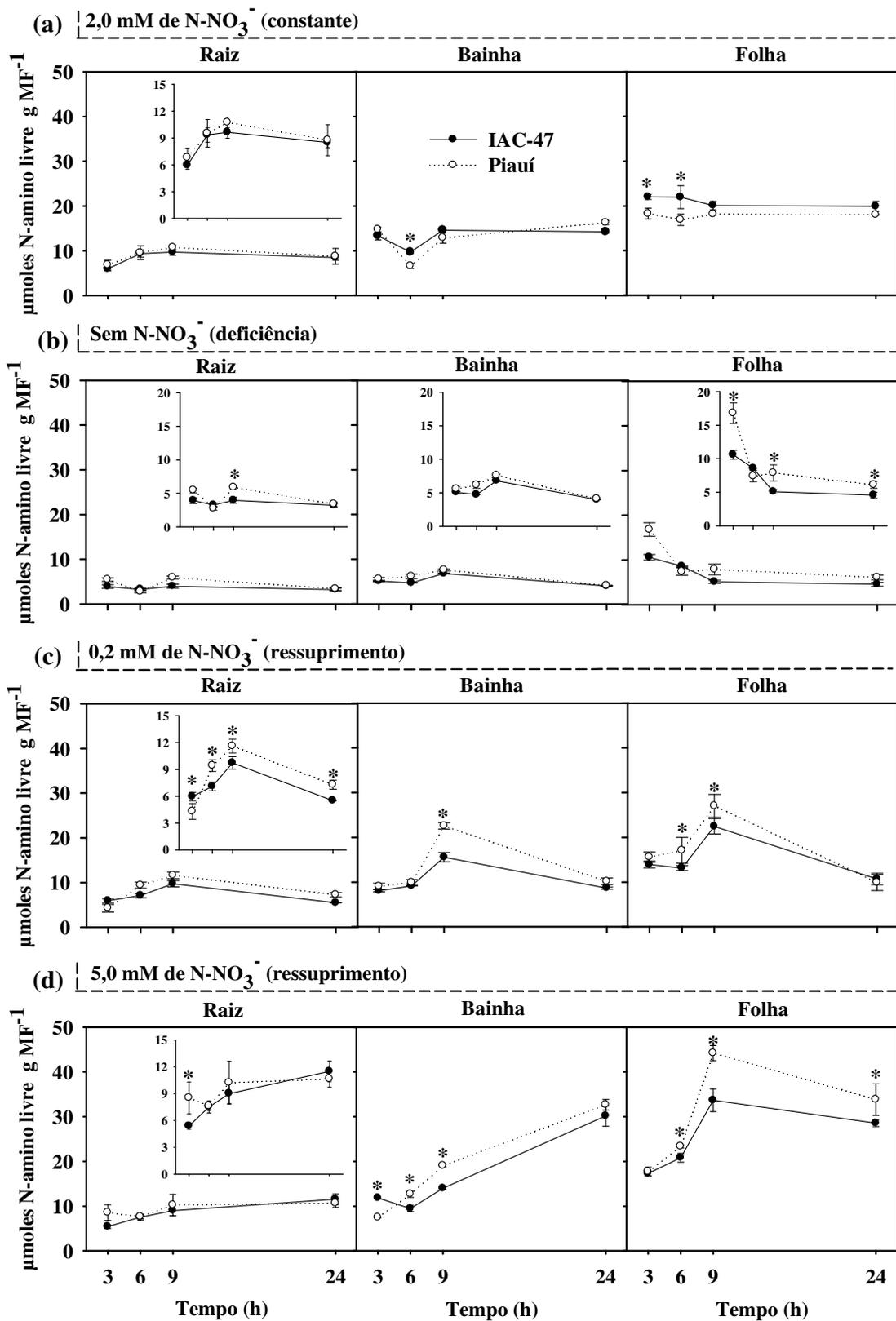
Segundo KATAYAMA et al. (2009) a super-expressão de *OsNRT2.1* em arroz gerou expressão constitutiva de *OsNRT2.2* nas linhagens mutantes em relação às plantas tipo-selvagem. Possivelmente *OsNRT2.1* pode atuar no controle da expressão de *OsNRT2.2* (KARAYAMA et al., 2009), no entanto essa regulação ainda não foi descoberta. Esses autores verificaram ainda que a super-expressão de *OsNRT2.1* não gerou maior absorção de  $\text{NO}_3^-$ , como seria esperado, possivelmente devido ao controle pós-traducional. Vale ainda ressaltar que as plantas mutantes super-expressando *OsNRT2.1* não apresentaram maior expressão de *OsNAR2.1*, sendo que *OsNAR2.1* é uma proteína chave para o funcionamento de *OsNRT2.1* (ORSEL et al., 2006), o que pode ter gerado absorção igual entre as plantas mutantes e tipo-selvagem. Os resultados de expressão gênica mostram que a variedade Piauí apresentou maior expressão de *OsNAR2.1* concomitante com maior expressão de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* no ressuprimento com 0,2 mM de N- $\text{NO}_3^-$ , mostrando que plantas de arroz com maior absorção de  $\text{NO}_3^-$  em baixas concentrações também expressaram mais *OsNAR2.1*.

No ressuprimento com 5,0 mM de N- $\text{NO}_3^-$ , a indução de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* no tempo 3 horas foi seguida por repressão até as 24 horas (Figura 14d). A absorção em altas concentrações de  $\text{NO}_3^-$  (maior que 1 mM) é efetuada predominantemente por membros dos transportadores de baixa afinidade (GLASS et al., 2009). A alteração do *status* de N na planta, resultante da absorção e assimilação de  $\text{NO}_3^-$  com produção de  $\text{NH}_4^+$  (Figura 15) e aminoácidos livres (Figura 16), reprime a expressão dos transportadores de alta afinidade, assim como a proteína NAR (GLASS et al., 2009; ORSEL et al., 2006).

Os teores de açúcares solúveis apresentaram aumento até o tempo de 9 horas após o ressuprimento em todas as partes analisadas e depois queda no tempo de 24 horas (Figura 17). Os resultados obtidos são decorrentes dos tempos de coleta. O aumento dos teores de açúcares na coleta de 9 horas e queda na coleta de 24 horas é decorrente do período de escuro e consumo nesse período sem fotossíntese. Os teores de açúcares solúveis representam a energia prontamente disponível para o metabolismo celular (SOUZA et al., 1998).



**Figura 15.** Teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (sem N), ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições.



**Figura 16.** Teores de N-amino livre em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (sem N), ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam média ± SE (erro padrão) de três repetições.

SANTOS et al. (2009) observaram que o aumento da atividade da PM  $H^+$ -ATPase levou ao decréscimo dos teores de açúcares solúveis, uma vez que aproximadamente 50% do ATP produzido é gasto na manutenção dos gradiente entre o citossol e apoplasto. Os resultados contrastantes em relação aos obtidos por SANTOS et al. (2009) podem ser decorrentes das condições de crescimento das plantas. Enquanto o experimento II foi conduzido com luminosidade de 650  $\mu\text{moles}$  de fótons fotossintetizantes/ $\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ , SANTOS et al. (2009) utilizou somente 80  $\mu\text{moles}$  de fótons fotossintetizantes/ $\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ , ou seja, menor taxa fotossintética. As bainhas apresentaram os maiores teores de açúcares solúveis, provavelmente decorrente da translocação de açúcares no floema.

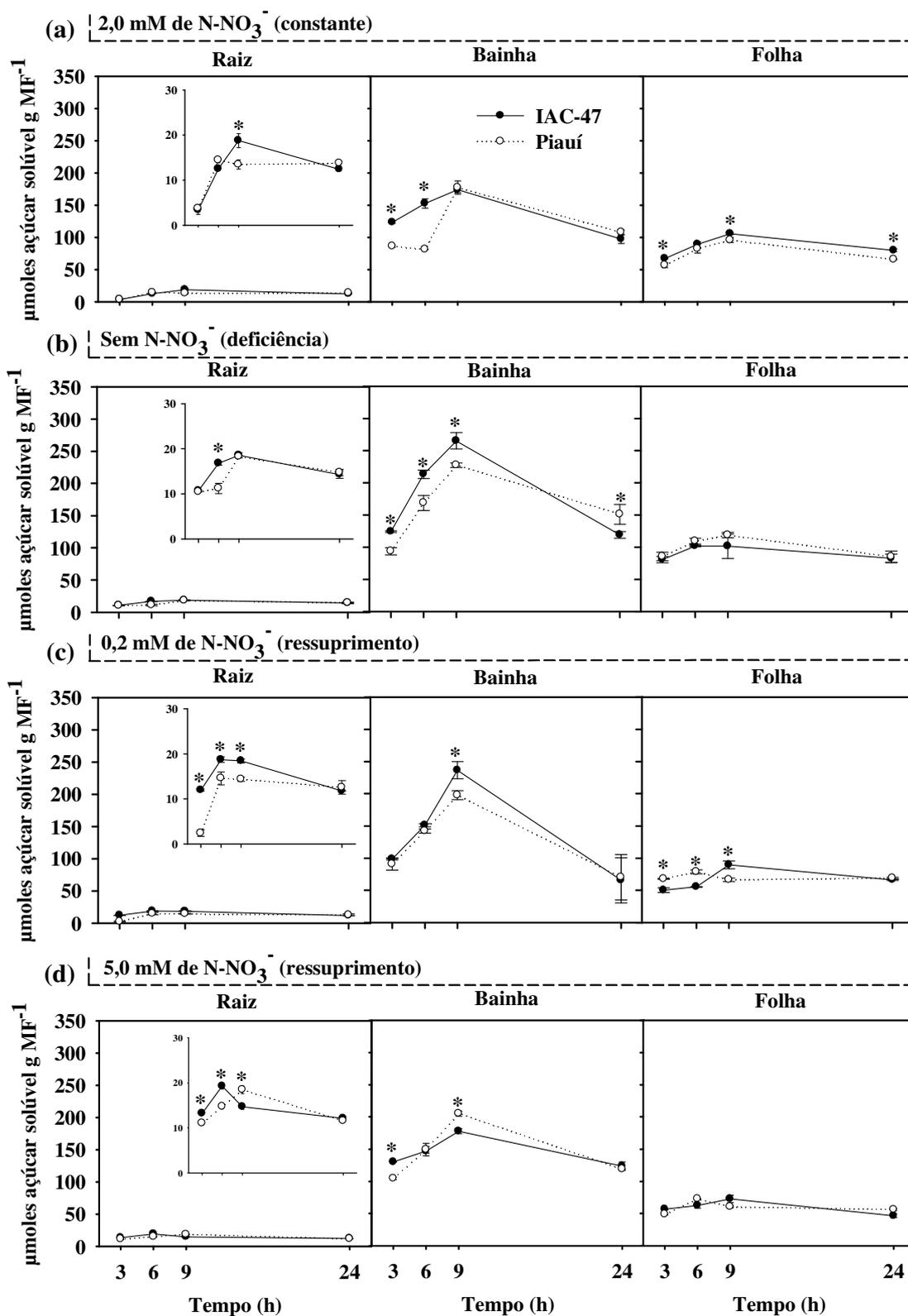
No suprimento constante com 2,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  os menores teores de  $N\text{-NH}_4^+$  foram encontrados na bainha, enquanto na folha e raiz a variedade IAC-47 apresentou maiores teores de  $N\text{-NH}_4^+$  (Figura 15a). Do mesmo modo que não foi detectado  $N\text{-NO}_3^-$  nas raízes das plantas sob deficiência de  $N\text{-NO}_3^-$ , não foi detectado  $N\text{-NH}_4^+$  nas raízes (Figura 15b), indicando o consumo do  $\text{NO}_3^-$  acumulado nesse tecido.

De modo geral, no ressurgimento com 0,2 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  a variedade Piauí acumulou maiores teores de  $N\text{-NH}_4^+$  em relação à variedade IAC-47 em todas as partes analisadas (Figura 15c), enquanto no ressurgimento com 5,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  a variedade IAC-47 apresentou maior de  $N\text{-NH}_4^+$  nas raízes (Figura 15d). Os maiores valores de  $N\text{-NH}_4^+$  foram obtidos no ressurgimento com 5,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  no tempo 24 horas (Figura 15d).

Os teores de N-amino livre foram constantes nas folhas e bainhas das plantas com suprimento constante de 2,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$ , enquanto nas raízes houve aumento de 1,5 vezes nos teores de N-amino livre (Figura 16a). Do mesmo modo que a deficiência de  $\text{NO}_3^-$  por três dias provocou menores níveis de  $N\text{-NO}_3^-$  (Figura 11b) e  $N\text{-NH}_4^+$  (Figura 15b), os teores de N-amino livre também foram menores, visto que plantas de 21 dias após a germinação estão em pleno crescimento e a reserva de N tende a diminuir com o aumento de massa (Figura 16b). Após três dias sem  $\text{NO}_3^-$ , a variedade Piauí apresentou maior teor de N-amino livre na folha em relação à variedade IAC-47 (Figura 16b).

O ressurgimento com 0,2 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  levou ao aumento dos teores de N-amino livre até o tempo 9 horas e diminuiu no tempo 24 horas em todas as partes analisadas (Figura 16c). Como os teores de  $N\text{-NO}_3^-$  foram baixos no ressurgimento com 0,2 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  no tempo 24 horas (Figura 11c), assim como os teores de N-amino livre nesse tratamento (Figura 16c), parte do  $\text{NO}_3^-$  pode ter sido usado para a síntese protéica em condições de deficiência de N. No entanto, com o ressurgimento de 5,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  houve aumento do N-amino livre ao longo do tempo, em todas as partes da planta, com os maiores teores chegando a 42  $\mu\text{moles}$  N-amino livre  $\text{g MF}^{-1}$ , observados nas folhas no tempo 9 horas (Figura 16d). Apesar dos maiores teores de  $N\text{-NO}_3^-$  e  $N\text{-NH}_4^+$  nas folhas com o ressurgimento de 5,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  no tempo 24 horas, os teores de N-amino livre foram maiores no tempo 9 horas, sugerindo que as plantas de arroz apresentam “saturação” dos níveis de aminoácidos livres. A variedade Piauí apresentou os maiores teores de N-amino livre no ressurgimento com 0,2 e 5,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$ , com exceção das raízes no ressurgimento com 0,2 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  no tempo 3 horas e nas bainhas das plantas sob ressurgimento de 5,0 mM de  $N\text{-NO}_3^-$  no tempo três horas.

A absorção de  $\text{NO}_3^-$  altera o *status* de N, relativo aos diferentes componentes nitrogenados como  $N\text{-NO}_3^-$ ,  $N\text{-NH}_4^+$  e N-amino livre. Essas moléculas são sinais para a absorção e assimilação de N nas plantas, podendo inibir a absorção de  $\text{NO}_3^-$  pela regulação transcricional ou pós-traducional (MILLER et al., 2008).



**Figura 17.** Teores de açúcares solúveis em plantas de arroz variedade IAC-47 e Piauí sob deficiência de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (sem N), ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (0,2 mM e 5,0 mM) e suprimento constante com 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Foram feitas coletas nos tempos 3, 6, 9 e 24 horas após o fornecimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As barras representam média  $\pm$  SE (erro padrão) de três repetições.

Como observado nas Figuras 13 e 14 a elevação dos teores de  $\text{N-NH}_4^+$  (Figura 15) e N-amino livre às 6 e 9 horas após o ressuprimento com 0,2 ou 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  pode explicar a forte redução da expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*, visto que a elevação dos teores de  $\text{NH}_4^+$  e aminoácidos livres agem como reguladores negativos da expressão desses genes (NAZOA et al., 2003). Às 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  os teores de  $\text{N-NH}_4^+$  e N-amino livre diminuíram, enquanto no ressuprimento com 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  os níveis de  $\text{N-NH}_4^+$  e N-amino livre permaneceram elevados, explicando parcialmente as diferenças de expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* quando plantas de arroz são submetidas à baixa ou alta dose de  $\text{NO}_3^-$ .

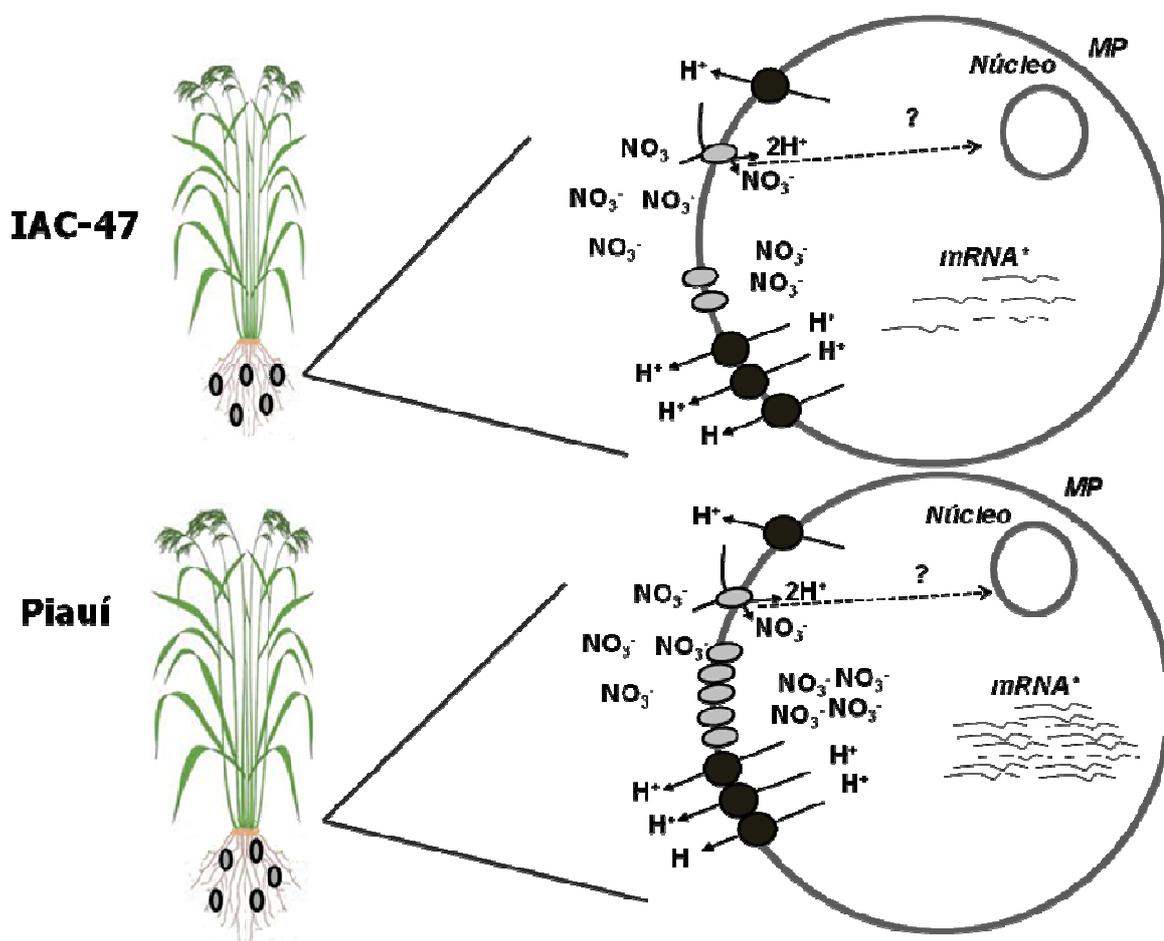
Apesar da regulação da expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* por  $\text{NH}_4^+$  e aminoácidos livres, a variedade Piauí apresentou maiores teores de  $\text{N-NH}_4^+$  e N-amino livre no ressuprimento com 0,2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  e manteve maiores níveis de expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*. Uma explicação poderia estar na composição do N-amino livre. Glutamina é o principal aminoácido envolvido na regulação da expressão dos transportadores de  $\text{NO}_3^-$ , sendo também o composto mais encontrado no *pool* de aminoácidos livres (GLASS et al., 2009). Talvez a variedade Piauí apresente menor teor de glutamina no *pool* de N-amino livre e por isso apresente maior expressão de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, no entanto, diversos fatores podem controlar a expressão desses genes. KANT et al. (2008) encontraram resultados similares, onde *Thellungiella halophila* (adaptada a baixo suprimento de N) apresentou maiores teores de aminoácidos e maior expressão de *AtNRT2.1* em condição limitante de N, quando comparada com a planta normal de *Arabidopsis*. A região promotora de *NRT2.1* apresenta sítios de ligação para diversos fatores de transcrição ligados ao metabolismo de C e N, como Dof (5'-AAAG-3') e GATA (5'-GATA-3'), levando à regulação de expressão de *NRT2.1* por diferentes sinais da planta (GIRIM et al., 2007). A super-expressão do gene *ZmDof1* em *Arabidopsis* alterou o metabolismo de C e N, apresentando maior teor de aminoácidos e N total (YANAGISAWA et al., 2004). SANTOS (2009) estudando a expressão de *OsDof25* em arroz em resposta ao  $\text{NO}_3^-$  verificou que esse gene foi induzido às três horas após o ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$ , apresentando exatamente o mesmo padrão de expressão de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* que encontramos nos experimentos I e II (Figura 8 e 14). No entanto, não é possível afirmar se o aumento expressão de *OsDof25*, em resposta ao ressuprimento de  $\text{NO}_3^-$ , é induzido por esse nutriente ou pelo aumento da demanda de esqueletos de carbono para a assimilação.

Esses trabalhos mostram a complexidade da regulação de expressão de genes relacionados à absorção de  $\text{NO}_3^-$ , sendo que nossos resultados indicam que a variedade de arroz Piauí apresenta melhor adaptação para condições de baixo suprimento de  $\text{NO}_3^-$  em relação à variedade de arroz IAC-47 através da maior expressão de transportadores de  $\text{NO}_3^-$  e PM  $\text{H}^+$ -ATPases.

Somente com ressuprimento de 0,2 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  os teores de  $\text{N-NH}_4^+$  foram maiores na variedade Piauí, enquanto nos tratamentos com suprimento constante com 2,0 mM e ressuprimento com 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  a variedade IAC-47 apresentou maiores teores de  $\text{N-NH}_4^+$  (Figura 15). YI-BO et al. (2010) estudando plantas de *Arabidopsis* contrastantes quanto ao uso de N verificaram que a linhagem mais eficiente no uso de N apresentou menores teores de  $\text{N-NH}_4^+$  nos tecidos, estando de acordo com os nossos resultados onde a variedade de arroz Piauí mais eficiente no uso de N também apresentou menores teores de  $\text{N-NH}_4^+$  nas raízes em altas doses de  $\text{NO}_3^-$  (ressuprimento com 5,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$  e suprimento constante com 2,0 mM de  $\text{N-NO}_3^-$ ) (Figura 15). De acordo com estes autores, os menores teores de  $\text{NH}_4^+$  estão associados à maior atividade das enzimas do ciclo GS – GOGAT que incorpora o  $\text{NH}_4^+$  em esqueletos de carbono. De fato, SOUZA et al. (1998) encontraram maior atividade de GS na variedade Piauí em relação à variedade IAC-47.

Os maiores teores de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e N-amino livre e menor de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> observados na variedade Piauí enfatizam características observadas por outros autores como marcas da eficiência de uso de N, indicando maior assimilação do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> produzido pela redução do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (SOUZA et al., 1998; KANT et al., 2008; YI-BO et al., 2010; MASCLAUX-DAUBRESSE, 2010). SANTOS et al. (2009) estudando remobilização de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí em condições de deficiência de N mostraram que a bainha é a principal parte da planta responsável pelo fornecimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Esses autores ainda mostram que a variedade Piauí apresenta maior eficiência de remobilização de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

De acordo com os resultados obtidos nos experimentos I e II, foi elaborado um modelo esquemático com os possíveis mecanismos que podem gerar as diferenças observadas entre a variedade IAC-47 e Piauí (Figura 18). A capacidade máxima de absorção está relacionada com número de sítios de absorção, ou seja, transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (FERNANDES & SOUZA, 2006). A maior expressão de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* na variedade Piauí, juntamente com *OsA2* e *OsA7* podem ser o mecanismo chave para maior absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, visto que esses mecanismos operam de forma sincronizada.



**Figura 18.** Modelo proposto para representar as diferenças de absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> entre as variedades de arroz IAC-47 e Piauí. *mRNA\** representa a expressão dos genes avaliados por PCR em tempo real no experimento II (*OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*, *OsNAR2.1*, *OsA2* e *OsA7*) e MP membrana plasmática.

Para avaliar a correlação entre os genes avaliados, foi analisado o coeficiente de Pearson (regressão linear) utilizando todos os tratamentos usados no experimento com as variedades de arroz IAC-47 e Piauí. Todas as correlações foram maiores que 0,8 (Tabela 4). Os maiores valores de correlação foram encontrados entre os genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (0,9599 na IAC-47 e 0,9232 na Piauí). KATAYAMA et al. (2009) verificaram que a super-expressão de *OsNRT2.1* também gerou expressão constitutiva de *OsNRT2.2*, sugerindo que *OsNRT2.1* regula a expressão de *OsNRT2.2* por mecanismos ainda não conhecidos. Os dois genes de PM H<sup>+</sup>-PM H<sup>+</sup>-ATPase mais induzidos pelo NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (*OsA2* e *OsA7*) também apresentaram alta correlação de expressão entre eles, assim como sua correlação com *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* em ambas as variedades. A alta correlação de expressão entre os genes relacionados com o transporte de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e geração de força próton-motriz mostra que a absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é um processo integrado.

**Tabela 4.** Correlação (Coeficiente de Pearson) entre *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*, *OsNAR2.1*, *OsA2* e *OsA7* nas variedades de arroz IAC-47 e Piauí.

Interação Gênica	Correlação (r)	
	IAC-47	Piauí
<i>OsNRT2.1</i> x <i>OsNRT2.2</i>	0,9599	0,9232
<i>OsNRT2.1</i> x <i>OsNAR2.1</i>	0,8466	0,8859
<i>OsNRT2.1</i> x <i>OsA2</i>	0,8853	0,9041
<i>OsNRT2.1</i> x <i>OsA7</i>	0,8567	0,8647
<i>OsNRT2.2</i> x <i>OsA2</i>	0,8991	0,8959
<i>OsNRT2.2</i> x <i>OsA7</i>	0,8733	0,8662
<i>OsNAR2.1</i> x <i>OsA2</i>	0,8505	0,8414
<i>OsNAR2.1</i> x <i>OsA7</i>	0,9136	0,8347
<i>OsA7</i> x <i>OsA2</i>	0,8377	0,8538

As características encontradas na variedade Piauí estão de acordo com seu local de origem, solos da baixada maranhense pobres em nutrientes e com fluxo sazonal de N, reproduzido neste trabalho pelo ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Possivelmente a maior capacidade de absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em condições de fluxo sazonal de N esteja relacionado com a maior expressão de transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e PM H<sup>+</sup>-ATPases nas raízes.

## 5. CONCLUSÕES

No experimento usando a variedade de arroz Nipponbare, concluímos que as isoformas de PM H<sup>+</sup>-ATPases mostram diferenças de expressão entre a fonte de N usada (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e houve isoformas que foram induzidas com o ressuprimento. Na deficiência e ressuprimento com N somente as plantas cultivadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentaram indução da expressão da PM H<sup>+</sup>-ATPase na parte aérea, o que sugere o envolvimento da expressão das PM H<sup>+</sup>-ATPases no processo de remobilização de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. As isoformas *OsA2* e *OsA7* são genes candidatos no processo de absorção de N pelas raízes, mostrando alta indução com o ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A isoforma *OsA7* é induzida pelo ressuprimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> nas raízes.

Usando as variedades de arroz contrastantes quanto ao uso de N, concluímos que a maior eficiência de uso de N na variedade Piauí em comparação à variedade IAC-47 pode ser sintetizada em: (i) maior expressão de transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> de alta afinidade; (ii) maior expressão de *OsA2* e *OsA7* e maior atividade da PM H<sup>+</sup>-ATPase 24 horas após o ressuprimento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (iii) acúmulo de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> em alta dose de N, (iv) maior absorção quando do ressuprimento de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

A eficiência de absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> está diretamente relacionada com a atividade concomitante das bombas de H<sup>+</sup> e transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Este trabalho identificou cinco genes (*OsA2*, *OsA7*, *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1*) que podem estar diretamente envolvidos na eficiência de aquisição de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por arroz.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMAGRO, A.; LIN, S.; TSAY, Y. Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. **The Plant Cell**, v. 20, p. 3289–3299, 2008.
- ARAKI, R. & HASEGAWA, H. Expression of Rice (*Oryza sativa* L.) Genes Involved in High-Affinity Nitrate Transport during the Period of Nitrate Induction. **Breeding Science**, v. 56, p. 295-302, 2006.
- ARANGO, M.; GEVAUDANT, F.; OUFATTOL, M.; BOUTRY, M. The plasma membrane proton pump ATPase: the significance of gene subfamilies. **Planta**, 216: 355–365, 2003.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L. & HUFFAKER, R. C. Comparative induction of nitrate and nitrite uptake and reduction systems by ambient nitrate and nitrite in intact roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology**, v.102, p.811-819, 1993.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; HUFFAKER, R. C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Plant Physiology**, v.99, n.3, p.1124-1133, 1992.
- BAXTER, I.; TCHIEU, J.; SUSSMAN, M. R.; BOUTRY, M.; PALMGREN, M. G.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J. F.; AXELSEN, K. B. Genomic comparison of P-type ATPase ion pump in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, v.132, p.618-628, 2003.
- BI, Y.M., ZHANG, Y., SIGNORELLI, T., ZHAO, R., ZHU, T., ROTHSTEIN, S. Genetic analysis of *Arabidopsis gata* transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity. **The Plant Journal**, v. 44, p. 680-692. 2005.
- BOBIK, K.; DUBY, G.; NIZET, Y.; VANDERMEEREN, C.; STIERNET, P.; KANCZEWSKA, J.; BOUTRY, M. Two widely expressed plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoforms of *Nicotiana tabacum* are differentially regulated by phosphorylation of their penultimate threonine. **The Plant Journal**, v. 62, p. 291-301, 2010.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.
- BRITTO, D. T.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; KRONZUCKER, H. J. Futile transmembrane NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, p. 4255-4258, 2001.
- BUCHER, C. A. **Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz**. 2007. 50f. Dissertação de Mestrado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Effects of fusicoccin and vanadate on proton extrusion and potassium uptake by rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29(3), p. 485-496, 2006.

- 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**, New York, US., v.6, p.853-855, 1975.
- CHANG, C.; HU, Y.; SUN, S.; ZHU, Y.; MA, G.; XU, G. Proton pump OsA8 is linked to phosphorus uptake and translocation in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 557–565, 2009.
- CHEN, Y. F.; WANG, Y.; WU, W.H. Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, p. 835–848, 2008.
- CHIU, C.-C.; LIN, C.-S.; HSIA, A.-P.; SU, R.-C.; LIN, H.-L.; TSAY, Y.-F. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1.4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. **Plant Cell Physiology**, v. 45, p. 1139–1148, 2004.
- CHOPIN, F.; WIRTH, J.; DORBE, M.F.; LEJAY, L.; KRAPP, A.; GOJON, A.; DANIEL-VEDELE, F. The Arabidopsis nitrate transporter AtNRT2.1 is targeted to the root plasma membrane. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 630-635, 2007.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, Quarto levantamento, janeiro 2011. **Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília: Conab**, 2011. 41p.
- DE ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; FRACHISSE, J. M.; THOMINE, S.; GAMBALE, F.; BARBIER-BRYGOO, H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. **Nature**, v. 442, p. 939-942, 2006.
- DUAN, Y. H., ZHANG, Y. L., YE, L. T., FAN, X. R., XU, G. H., SHEN, Q. R. Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. **Annals of Botany**, v.99, p.1153–1160, 2007.
- DUBY, G.; BOUTRY, M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. **European Journal of Physiology**, v.457, p. 645-655, 2009.
- EWING, R. M.; KAHLA, A. B.; POIROT, O.; LOPEZ, F.; AUDIC, S.; CLAVERIE, J. M. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. **Genome Research**, v. 9, p. 950-959, 1999.
- FAÇANHA, A. R.; DE MEIS, L. Inhibition of maize root H<sup>+</sup>-ATPase by fluoride and fluoroaluminate complexes. **Plant Physiology**, v. 108, p. 241-246, 1995.
- FAN, S.-C.; LIN, C.-S.; HSEU, P.-K.; LIN, S.-H.; TSAY, Y.-F. The arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. **The Plant Cell**, v. 21(9), p. 2750-2761, 2009.
- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, p.1980, 1977.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, San Jose, CR, v.34, p.9-18, 1984.
- FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES M. S. (Org.). **Nutrição Mineral de Plantas**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, v. 1, p. 115-152.
- FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. **In.: 45a Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade internacional de Biometria**, UFSCar, São Carlos – SP, pp. 255-258, 2000.

- FORDE, B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1465, p.219-235, 2000.
- FUGLSANG, A. T.; GUO, Y.; CUIN, T. A.; QIU, Q.; SONG, C.; KRISTIANSEN, K. A.; BYCH, K.; SHULZ, A.; SHABALA, S.; SCHUMAKER, K. S.; PALMGREN, M. G.; ZHU, J.-K. *Arabidopsis* Protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. **The Plant Cell**, v. 19, p. 1617-1634, 2007.
- GANSEL, X.; MUÑOS, S.; TILLARD, P.; GOJON, A. Differential regulation of the NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter genes *AtNrt2.1* and *AtAmt1.1* in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. **The Plant Journal**, v. 26(2), p.143-155, 2001.
- GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 185 – 185, 2001.
- GARNETT, T.; CONN, V.; KAISER, B. N. Root based approaches to improving nitrogen use efficiency in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 32, p. 1272-1283, 2009.
- GAXIOLA, R. A., PALMGREN, M .G., SCHUMACHER, K. Plant proton pumps. **FEBS Letters**, v. 581, p.2204 – 2214, 2007.
- GÉVAUDANT, F.; DUBY, G.; STEDINGK, E. V.; ZHAO, R.; MORSOMME, P.; BOUTRY, M. Expression of a constitutively activated plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase alters plant development and increases salt tolerance. **Plant Physiology**, v. 144, 1763-1776, 2007.
- GIRIM, T., LEJAY, L., WIRTH, J., WIDIEZ, T., PALENCHAR, P. M., NAZOA, P., TOURAINÉ, B., GOJON, A., LEPETIT, M. Identification of a 150 bp cis-activating element of the *AtNRT2.1* promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status in the plant. **Plant, Cell and Environment**, v. 30 p. 1366-1380, 2007.
- GLASS, A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 453–470, 2003.
- GLASS, A. D. M. Nitrate uptake by plant roots. **Botany**, v. 87, p. 659–667, 2009.
- GRAFF, L.; OBRDLIK, P.; YUAN, L.; LÓQUE, D.; FROMMER, W. B.; VON WIRÉN, N. N-terminal cysteines affect oligomer stability of the allosterically regulated ammonium transporter LeAMT1;1. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1361–1373, 2011.
- HAGER, A. Role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. **Journal of Plant Research**, v. 116, p. 483–505. 2003.
- HARPER, J. F.; MANNEY, L.; SUSSMAN, M. R. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of *AHA10* which is expressed primarily in developing seeds. **Molecular Genetic Genetics**, v. 244, p. 572–587, 1994.
- HARUTA, M.; BURCH, H. L.; NELSON, R. B.; BARRET-WILT, G.; KLINE, K. G.; MOHSIN, S. B.; YOUNG, J. C.; OTEGUI, M. S.; SUSSMAN, M. R. Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285 (23), p. 17918–17929, 2010.
- HERDER, G. D.; ISTERDAEL, G. V.; BEECKMAN, T.; SMET, I. D.; The roots of a new green revolution. **Trend in Plant Science**, v.15, p. 600-607, 2010.
- 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.

- HIREL, B.; LEGOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2369–2387, 2007.
- HO, C. H.; LIN, S. H.; HU, H. C.; TSAY, Y. F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell**, v.138, p. 1184–1194, 2009.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Stn. Bull**, v.347, p.1-32, 1950.
- HOQUE, M. S.; MASLE, J.; UDVARDI, M. K.; RYAN, P. R.; UPADHYAYA, N. M. Over-expression of the rice *OsAMT1-1* gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 153-163, 2006.
- HU, H. C., WANG, Y. Y., TSAY, Y. F. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. **The Plant Journal**, v. 57, p. 264–278, 2009.
- HUANG, N. C.; LIU, K. H.; LO, H. J.; TSAY, Y. F. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **The Plant Cell**, v. 11, p. 1381–1392, 1999.
- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 345, p. 646-651, 2006.
- JAMPEETONG, A.; BRIX, H. Effects of  $\text{NH}_4^+$  concentration on growth, morphology and  $\text{NH}_4^+$  uptake kinetics of *Salvinia natans*. **Ecological Engineering**, v.35, p.695-702, 2009.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research Communication**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- KAISER, B. N.; RAWAT, S. R.; SIDDIQI, M. Y.; MASLE, J.; GLASS, A. D. M. Functional analysis of an arabidopsis T-DNA ‘knockout’ of the high-affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, v.130, p.1263–1275, 2002.
- KALAMPANAYIL, B. D, WIMMER, L. E. Identification and characterization of salt-stress-induced plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase in tomato. **Plant Cell and Environment**, v.24, p.999-1005, 2001.
- KANT, S.; BI, Y. M.; WERETILNYK, E.; BARAK, S.; ROTHSTEIN, S. J. The arabidopsis halophytic relative *Thellungiella halophila* tolerates nitrogen-limiting conditions by maintaining growth, nitrogen uptake, and assimilation. **Plant Physiology**, v. 147, p. 1168-1180, 2008.
- KATAYAMA, H.; MORI, M.; KAWAMURA, Y.; TANAKA, T.; MORI, M.; HASEGAWA, H. Production and characterization of transgenic plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene (*OsNRT2.1*). **Breeding Science**, v. 59, p. 237-243, 2009.
- KAWACHI, T.; SUNAGA, Y.; EBATO, M. Repression of nitrate uptake by replacement of asp105 by asparagine in Atnrt3.1 in *Arabidopsis thaliana* L. **Plant And Cell Physiology**, v. 47, i. 10, p.1437-1441, 2006.
- KRAISER, T.; GRAS, D. E.; GUTIÉRREZ, A. G.; GONZÁLEZ, B.; GUTIÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1455–1466, 2011.

- KREBS, M.; BEYHL, D.; GÖRLICH, E.; AL-RASHEID, K. A. S.; MARTEN, I.; STIERHOF, Y.-D.; HEDRICH, R.; SCHUMACHER, K. Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107(7), p. 3251-3256, 2010.
- KROUK, G.; LACOMBE, B.; BIELACH, A.; PERRINE-WALKER, F.; MALINSKA, K.; MOUNIER, E.; HOYEROVA, K.; TILLARD, P.; LEON, S.; LJUNG, K.; ZAZIMALOVA, E.; BENKOVA, E.; NACRY, P.; GOJON, A. Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. **Developmental Cell**, v. 18, p. 927-937, 2010.
- LANQUAR, V.; LOQUÉ, D.; HORMANN, F.; YUAN, L.; BOHNER, A.; ENGELSBERGER, W. R.; LALONDE, S.; SCHULZE, W. X.; VON WIRÉN, N.; FROMMER, W. B. Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 21, p. 3610-3622, 2009.
- LEJAY, L., GANSEL, X., CEREZO, M., TILLARD, P., MULLER, C., KRAPP, A., VON WIREN, N., DANIEL-VEDELE, F. & GOJON, A. Regulation of root ion transporters by photosynthesis: functional importance and relation with hexokinase. **The Plant Cell**, v.15, 2218-2232, 2003.
- LI, B.; XIN, W.; SUN, S.; SHEN, Q.; XU, G. Physiological and molecular responses of nitrogen-starved rice plants to re-supply of different nitrogen sources. **Plant Soil**, v. 287, p. 145-159, 2006.
- LI, J.-Y.; FU, Y.-L.; PIKE, S. M.; BAO, J.; TIAN, W.; ZHANG, Y.; CHEN, C.-Z.; ZHANG, Y.; LI, H.-M. HUANG, J.; LI, L.-G.; SCHROEDER, J. I.; GASSMANN, W.; GONG, J.-M. The arabidopsis nitrate transporter NRT1.8 functions in nitrate removal from the xylem sap and mediates cadmium tolerance. **The Plant Cell**, v. 22(5), p. 1633-1646, 2010.
- LI, J.; YANG, H.; PEER, W. A.; RICHTER, G.; BLASKELEE, J.; BANDYOPADHYAY, A.; TITAPIWANTAKUN, B.; UNDURRAGA, S.; KHODAKOVSKAYA, M.; RICHARDS, E. L.; KRIZEK, B.; MURPHY, A. S.; GILROY, S.; GAXIOLA, R. Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. **Science**, v. 310, p. 121-125, 2005.
- LI, W.; WANG, Y.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N. M.; SIDDIQI, Y.; GLASS, A. D. M. Dissection of the *AtNRT2.1:AtNRT2.2* inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, v. 143, p. 425-433, 2007.
- LIAN X.; WANG, S.; ZHANG, J.; FENG, Q.; ZHANG L.; FAN, D.; LI, X.; YUAN D.; HAN. B.; ZANG, Q. Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p. 617-631, 2006.
- LIMA, J. E.; KOJIMA, S.; TAKAHASHI, H.; VON WIRÉN, N. Ammonium triggers lateral root branching in arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. **The Plant Cell**, v. 22(11), p. 3621-3633, 2010.
- LIN, S. H.; KUO, H. F.; CANIVENC, G.; LIN, C.-S.; LEPETIT, M.; HSU, P.-K.; TILLARD, P.; LIN, H.-L.; WANG, Y.-Y.; TSAI, C.-B.; GOJON, A.; TSAY, Y.-F. Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. **The Plant Cell**, v. 20, p. 2514-2528, 2008.
- LIU, J.; CHEN, F.; OLOKHNUUD, C.; GLASS, A. D. M.; TONG, Y.; ZHANG, F.; MI, G. Root size and nitrogen-uptake activity in two maize (*Zea mays*) inbred lines differing in

- nitrogen-use efficiency. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 172, p. 230-236, 2009.
- LIU, J.; HAN, L.; CHEN, F.; BAO, J.; ZHANG, F.; MI, G. Microarray analysis reveals early responsive genes possibly involved in localized nitrate stimulation of lateral root development in maize (*Zea mays* L.). **Plant Science**, v. 175, p. 272-282, 2008.
- LIU, K. H., AND TSAY, Y. F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **Embo Journal**, v. 22, p. 1005–1013, 2003.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOQUE, D.; LALONDE, S.; LOOGER, L. L.; WIREN, N.; FROMMER, W. B. Acytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. **Nature**, v. 446, p. 195-198, 2007.
- MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p.250-258, 2009.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v.105(7), p. 1141-1157, 2010.
- MILLER, A. J.; CRAMER, M. D. Root nitrogen acquisition and assimilation. **Plant and Soil**, v. 274, p. 1-36, 2004.
- MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; STITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 9, p. 2297- 2306, 2007.
- MILLER, A. J.; FAN, X.; SHEN, Q.; SMITH, S. J. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, p. 111–119, 2008.
- MŁODZINSKA, E.; WDOWIKOWSKA, A.; KŁOBUS, G. Identification and characterization of two genes encoding plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Cucumis sativus* L. **Acta Plant Physiology Plant**, v. 32, p. 1103-1111, 2010.
- NAZOA, P.; VIDMAR, J. J.; TRANBARGER, T. J.; MOULINE, K.; DAMIANI, I.; TILLARD, P.; ZHUO, D.; GLASS, A. D. M. & TOURAINÉ, B. Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: response to nitrate, amino acids and development stage. **Plant Molecular Biology**, v.52, p.689-703, 2003.
- OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J. & GLASS, A. D. M. Regulation of NRT1 and NRT2 genes families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant and Cell Physiology**, v.44, n.3, p.304-317, 2003.
- ORSEL, M.; CHOPIN, F.; LELEU, O.; SMITH, S. J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F.; MILLER.; A. Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. **Plant Physiology**, v. 142, p. 1304-1317, 2006.
- 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.
- OTTMANN, C.; MARCO, S.; JASPERT, N.; MARCON, C.; SCHAUER, N.; WEYAND, M.; VANDERMEEREN, C.; DUBY, G.; BOUTRY, M.; WITTINGHOFER, A.; RIGAUD, J.-L.; OECKING, C. Structure of a 14-3-3 coordinated hexamer of the plant plasma

membrane H<sup>+</sup>-ATPase by combining X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. **Molecular Cell**, v. 25, p. 427–440, 2007.

OUFATTOLE, M.; ARANGO M. & BOUTRY, M. Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of a plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. **Planta**, v. 210, p. 715-722, 2000.

PATTERSON, K.; CAKMAK, T.; COOPER, A.; LAGER, I.; RASMUSSEN, A. L.; ESCOBAR, M. A. Distinct signalling pathways and transcriptome response signatures differentiate ammonium and nitrate-supplied plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, p. 1486–1501, 2010.

PIFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2003 – 2009, 2001.

PIFAFFL, M. W., HAGELEIT, M. Validations of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-times RT-PCR. **Biotechnology Letters**, v 23, p. 275–282, 2001.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T. & MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporter and of an H<sup>+</sup>-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1023-1031, 2003.

QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.55, n.398, p.803-813, 2004.

RUDD, S. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? **Trends in Plant Science**, v. 8, p. 321-329, 2003.

SAHU, B. B.; SHAW, B. P. Salt-inducible isoform of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene in rice remains constitutively expressed in natural halophyte, *Suaeda maritima*. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, p. 1077-1089, 2009.

SAMBORSKI, S., KOZAK, M., AZEVEDO, R. A. Does nitrogen uptake affect nitrogen uptake efficiency, or vice versa? **Acta Physiol Plant**, v.30, p. 419–420, 2008.

SANTI, S.; CESCO, S.; VARANINI, Z.; PINTON, R. Two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43p. 287–292, 2005.

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<sup>+</sup>-ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1851-1864, 2003.

SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in maize roots induced for NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1277-1283, 1995.

SANTOS, L. A., BUCHER, C. A., SOUZA, S. R., FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 549 – 564, 2009.

SHEN, H.; CHEN, J.; WANG, Z.; YANG, C.; SASAKI, T.; YAMAMOTO, Y.; MATSUMOTO, H.; YAN, X. Root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in the

adaptation of soybean to phosphorus starvation. **Journal of Experimental Botany**, v. 57(6), p. 1353-1362, 2006.

SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; RUTH, T. J. & RUFTY, T. Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of  $^{13}\text{NO}_3^-$  influx. **Plant Physiology**, v.93, p.1426-1432, 1990.

SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. **Plant Physiology**, v.136, p.2475-2482, 2004.

SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S.; WIRÉN, N. V.; YAMAYA, T.; YAMAGUCHI, J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1* – *1;3*) in rice. **Plant Cell Physiology**. v. 44, p. 726-734, 2003.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogen-acquisition by plants in a sustainable environment. In: SINGH, R.P.; JAIWAL P.K. (Org.). **Biotechnological approaches to improve nitrogen use efficiency in plants**. 1 ed. India: Studium Press, LLC, Houston, Texas, USA., v. 1, p. 41-62, 2006a.

SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. (Org.). **Nutrição Mineral de Plantas**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006b.

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.

THIBAUD, J. B.; GRIGNON, C. Mechanism of nitrate uptake in corn roots. **Plant Science**, v. 22, p. 279-289,1981.

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

VITART, V; BAXTER, I; DOERNER, P.; HARPER, J. F. Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase in the root endodermis. **Plant Journal**, v. 27, p. 191–201, 2001.

WIRTH, J.; CHOPIN, F.; SANTONI, V.; VIENNOIS, G.; TILLARD, P.; KRAPP, A.; LEJAY, L.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Regulation of root nitrate uptake at the *NRT2.1* protein level in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 32, p. 23541-23552, 2007.

YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T. Metabolic engineering with *DOF1* transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low nitrogen conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 7833–7838, 2004.

YEMM, E. W. AND COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemical**, v.80, p.209-213, 1955.

YI-BO, T.; YA-JUAN, L.; PING, F.; GUI-XIAO, L. Characterization of nitrogen metabolism in the low-nitrogen tolerant *Int1* mutant of *Arabidopsis thaliana* under nitrogen stress. **Pedosphere**, v. 20(5), p. 623–632, 2010.

YIN, L.-P.; LI, P.; WEN, B.; TAYLOR, D.; BERRY, J. O. Characterization and expression of a high-affinity nitrate system transporter gene (*TaNRT2.1*) from wheat roots, and its evolutionary relationship to other *NRT2* genes. **Plant Science**, v. 172, p. 621–631, 2007.

- YONG, Z.; KOTUR, Z.; GLASS, A. D. M. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from arabidopsis roots. **The Plant Journal**, v. 63, p. 739–748, 2010.
- YUAN, L., LOQUE, D., YE, F., FROMMER, W. B., WIRÉN, N. V. Nitrogen-dependent posttranscriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, v. 143, p. 732-744, 2007.
- ZHANG, H.; FORDE, B. G. Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. **Journal of Experimental Botany**, v.51, n.342, p.51-59, 2000.
- ZHAO R. M., DIELEN V., KINET J. M., BOUTRY, M. Cosuppression of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase isoform impairs sucrose translocation, stomatal opening, plant growth, and male fertility. **Plant Cell**, v.12, v.4, p.535-546, 2000.
- ZHOU, J. J.; TRUEMAN, L. J.; BOORER, K. J. A high affinity fungal nitrate carrier with two transport mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, i. 51, p. 39894-39899, 2000.

## 7. ANEXO

**Tabela Anexo.** Número de *Expressed Sequence Tags* (EST) das PM H<sup>+</sup>-ATPases em arroz baseado na busca nos bancos de dados de arroz (TIGR - <http://rice.plantbiology.msu.edu>) (YUAN et al., 2005).

Gene	Nº ESTs	Calos	Mixado	Folha	Toda planta	Panicula	Raiz	Parte Aérea	Plântulas	Anteras	Suspensão celular	Flor	Bainha	Semente imatura	Estame	Pistilo	Endosperma	Ponta de raiz	Semente	Desconhecido	Floema	Tecido s/ referência
<i>OsA1</i>	152	4	1	-	1	-	-	3	-	121	-	2	-	-	-	8	-	-	4	1	-	5
<i>OsA2</i>	364	60	5	5	3	5	11	58	-	10	-	101	-	-	-	62	1	-	32	8	-	1
<i>OsA3</i>	37	5	-	6	2	6	2	3	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	-	1	-	2
<i>OsA4</i>	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
<i>OsA5</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>OsA6</i>	16	-	8	-	-	1	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>OsA7</i>	1413	201	241	147	10	159	156	169	1	-	-	145	-	-	1	51	1	-	111	11	-	-
<i>OsA8</i>	7	2	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	1
<i>OsA9</i>	19	4	2	-	-	3	1	2	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	-	-	1
<i>OsA10</i>	13	-	1	-	-	4	-	2	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<b>Total ESTs</b>	<b>2028</b>	<b>273</b>	<b>258</b>	<b>158</b>	<b>15</b>	<b>178</b>	<b>170</b>	<b>239</b>	<b>1</b>	<b>131</b>	<b>0</b>	<b>263</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>134</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>147</b>	<b>21</b>	<b>0</b>	<b>12</b>