

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

DISSERTAÇÃO

**Absorção e Remobilização de NO_3^- em Arroz
(*Oryza sativa* L.): Atividade das Bombas de
Prótons e a Dinâmica do Processo**

Leandro Azevedo Santos

2006



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

ABSORÇÃO E REMOBILIZAÇÃO DE NO_3^- EM ARROZ
(*Oryza sativa* L.): ATIVIDADE DAS BOMBAS DE PRÓTONS E A
DINÂMICA DO PROCESSO

LEANDRO AZEVEDO SANTOS

Sob a Orientação do Professor

Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação da Professora

Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2006

Santos, Leandro Azevedo, 1981 -

Adsorção e remobilização de NO_3^- em arroz (*Oryza sativa*): Atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo./Leandro A. Santos. – 2006. 74f. : il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 60-66.

1. Solos – Absorção de nitrato – Teses. 2. Nutrição de plantas – Teses. 3. Solos – Remobilização de nitrato – Teses. 4. Solos – Bombas de prótons. I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Agronomia. III. Título

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

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

LEANDRO AZEVEDO SANTOS

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 21/02/2006

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

Sonia Regina de Souza. Dr. UFRRJ
(Co-orientadora)

José Ronaldo Magalhães. Ph.D. Embrapa Gado de Leite

Carlos Pimentel. Ph.D. UFRRJ

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

Aos meus queridos e amados pais, Sebastião Oliveira Santos e Gerside Abreu Azevedo Santos que sempre me deram forças e torceram por mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amparo que sempre me foi dado em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, Sebastião Oliveira Santos e Gerside Abreu Azevedo Santos que com muito amor, carinho, compreensão e apoio incondicional me deram forças no que fosse necessário para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Aos meus irmãos Eileen Azevedo Santos e Huarrisson Azevedo Santos pelo apoio e conselhos valiosos.

A minha companheira Samara Salamene, pelo apoio, carinho e compreensão em todos os momentos que precisei.

Ao Dr. Manlio Silvestre Fernandes pela orientação e ensinamentos sobre pesquisa científica.

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

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

Ao Dr. Arnaldo Rocha Façanha pelo auxílio nas técnicas utilizadas.

Aos colegas Carlos Alberto Bucher e Wallace Luís de Lima pelo apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais.

Aos bolsistas e estagiários: Walterliny Almeida Santos, Victor Hugo Criado Berbert e Natália Pereira Zatorre pela ajuda constante no preparo de soluções, matérias e tudo que fosse necessário.

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

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento.

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

BIOGRAFIA

Leandro Azevedo Santos nascido em 24 de outubro de 1981, na cidade de Santana-BA. Concluiu o ensino fundamental na cidade de Sítio do Mato-BA e o ensino médio na Escola Agrotécnica Federal de Januária - MG, adquirindo o título de Técnico em Agropecuária. Em 1999, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UFRRJ. Durante a graduação, foi bolsista por quatro anos do CNPq/PIBIC, onde participou de trabalhos junto à equipe de estudos sobre agroecologia na Embrapa Agrobiologia. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo em fevereiro de 2004. Em março de 2004, ingressou no programa de pós-graduação ao nível de mestrado, em Agronomia - Ciência do Solo na UFRRJ. Foi bolsista do CNPq durante o primeiro ano do mestrado e no segundo ano foi bolsista da FAPERJ programa aluno nota 10.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Absorção e Transportadores de Nitrato	4
2.2 H ⁺ -ATPases de Plasmalema ou P-H ⁺ -ATPase	5
2.3 Destino do Nitrato no Interior da Planta	8
2.4 Redução e Assimilação do Nitrato	9
2.5 Acúmulo de Nitrato nos Tecidos Vegetais	10
2.6 Remobilização do Nitrato Acumulado	11
2.7 H ⁺ -ATPase Vacuolar (EC 3.6.1.3)	11
2.7.1 A V-ATPase e sua relação com a F-ATPase	13
2.7.2 Acoplamento da hidrólise de ATP com o fluxo de H ⁺	14
2.7.3 Características da atividade das V-ATPase e inibidores	15
2.7.4 Distribuição das V-ATPases	15
2.7.5 Efeito de estresses ambientais sobre a V-ATPase	16
2.8 Pirofosfatase Vacuolar ou V-PPase (EC 3.6.1.1)	17
2.8.1 Origem do PPi na célula vegetal	18
2.8.2 Estrutura da V-PPase	19
2.8.3 Tamanho funcional das V-PPases	19
2.9 Envolvimento do Nitrato nos Processos Fisiológicos das Plantas	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Metabolismo de N em Arroz sob Deficiência de N-NO ₃ ⁻	21
3.2 Dinâmica de Absorção do Nitrato	21
3.2.1 Isolamento de vesículas de plasmalema e tonoplasto	22
3.2.2 Quantificação de proteína	23
3.2.3 Atividade das PM-H ⁺ -ATPases, V-H ⁺ -ATPases e H ⁺ -PPases	23
3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	24
3.3 Dinâmica de Remobilização do Nitrato	24
3.3.1 Variedade Piauí	24
3.3.2 Variedade IAC-47	25
3.4 Efeito do KNO ₃ sobre a Atividade das P-H ⁺ -ATPases	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 Metabolismo de N em Arroz sob Deficiência de N-NO ₃ ⁻	26
4.2 Dinâmica de Absorção de NO ₃ ⁻ entre as Variedades Piauí e IAC-47	31
4.3 Dinâmica de Remobilização do Nitrato (Var. Piauí)	44
4.4 Dinâmica de Remobilização de Nitrato (Comparação entre Piauí e IAC-47)	53
4.5 Exemplo do Efeito de KNO ₃ sobre a Atividade das P-H ⁺ -ATPases	56
5. CONCLUSÕES	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8. ANEXOS	67

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Nomenclatura proposta para os genes das subunidades da V-ATPase e proteínas em plantas..... 12
- Tabela 2.** Atividade da Nitrato Redutase ($\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1}$ de MF h⁻¹) em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz cultivadas com 2 mmoles L⁻¹ de NO₃⁻ na solução nutritiva ou sob depleção do NO₃⁻ durante 72 h..... 27
- Tabela 3.** Teores de N-NO₃⁻ ($\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ de massa fresca), N-Amino ($\mu\text{moles de N-Amino g}^{-1}$ de massa fresca), N-NH₄⁺ ($\mu\text{moles de NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$ de massa fresca) e Açúcares solúveis ($\mu\text{moles de açúcares solúveis g}^{-1}$ de massa fresca) em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz cultivadas com 2 mmoles L⁻¹ de NO₃⁻ na solução nutritiva ou sob depleção do NO₃⁻ durante 72 h..... 28
- Tabela 4.** N-total (mg de N g⁻¹ de massa seca) e Massa fresca (g) observada em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz cultivadas com 2 mmoles L⁻¹ de NO₃⁻ na solução nutritiva ou sob depleção do NO₃⁻ durante 72 h..... 30
- Tabela 5.** Massa fresca (g/vaso) de raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas concentrações de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmoles.L⁻¹). 31
- Tabela 6.** Teores de N-NO₃⁻, N-Amino, açúcares solúveis e N-NH₄⁺ nas folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz (var. IAC-47) na presença de 2 mmoles L⁻¹ de N-NO₃⁻ e após tratamento com 48h de privação de NO₃⁻ em solução nutritiva. 56

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema estendido da P-H⁺-ATPase, mostrando o efeito da fusicocina na ativação irreversível desta proteína..... 6
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do movimento do NO₃⁻ no interior da célula vegetal e sua relação com a ação das bombas de prótons..... 8
- Figura 3.** Modelo estrutural das V-ATPases e comparação com as F-ATPases. Fonte: KAWASAKI-NISHI et al. (2003)..... 13
- Figura 4.** Mecanismo rotatório proposto para translocação de prótons pelas V-ATPases. 14
- Figura 5.** Rota de sinal de transdução induzida pelo suprimento localizado de nitrato estimulando o alongamento de raízes laterais. Copiado de FORDE (2000a). 20
- Figura 6.** Esquema do experimento realizado para avaliação da dinâmica de absorção de NO₃⁻ entre variedades tradicionais e melhoradas de arroz. 22
- Figura 7.** Depleção de nitrato na solução nutritiva por plantas de arroz (var. Caiapó). 26
- Figura 8.** Depleção de N-NO₃⁻ na solução nutritiva com o cultivo de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a 0,2 mmoles.L⁻¹ (A) e 2 mmoles.L⁻¹ de N-NO₃⁻ (B), depois de 72 horas de privação deste nutriente. 32
- Figura 9.** Variação de pH em solução nutritiva causada por duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) sob duas concentrações de N-NO₃⁻ (0,2 mmoles.L⁻¹ - A e 2 mmoles.L⁻¹ - B), depois de 72 horas de privação deste nutriente. As figuras C e D se referem a médias de pH e concentração de prótons em intervalos de tempo definidos pelas linhas pontilhadas verticais na figura acima nas concentrações de 0,2 (C) e 2 mmoles.L⁻¹ de NO₃⁻ (D). 34
- Figura 10.** Atividade das P-H⁺-ATPases nas raízes e bainhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), submetidas a 0,2 mmoles.L⁻¹ (A e C) e 2 mmoles.L⁻¹ de NO₃⁻ (B e D) depois de 72h de privação de este nutriente. 35
- Figura 11.** Atividade das V-H⁺-ATPases nas raízes e bainhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), submetidas a duas concentrações de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmoles.L⁻¹) depois de 72h de privação de este nutriente..... 36
- Figura 12.** Atividade das H⁺-PPases nas raízes e bainhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), submetidas a duas concentrações de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmoles.L⁻¹) depois de 72h de privação de este nutriente. 37
- Figura 13.** Atividade da nitrato redutase (NR) nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmoles.L⁻¹) depois de 72 horas de privação deste nutriente..... 38
- Figura 14.** Visão geral das barreiras de transporte no corpo da planta e a energização da absorção celular de nutrientes pelas H⁺-ATPases da membrana plasmática. Fonte: SONDERGAARD et al. (2005). 39
- Figura 15.** Teores de N-NO₃⁻ nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmoles.L⁻¹) depois de 72 horas de privação deste nutriente. 40

Figura 16. Atividade da Glutamina Sintetase (GS) nas raízes, bainhas e folhas das variedades Piauí e IAC-47 submetidas a 0,2 e 2 mmoles L ⁻¹ de N-NO ₃ ⁻ depois de 72 horas de privação deste nutriente.	41
Figura 17. Teores de N-Amino nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO ₃ ⁻ (0,2 e 2 mmoles.L ⁻¹) depois de 72 horas de privação deste nutriente.	43
Figura 18. Teores de açúcares solúveis nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO ₃ ⁻ (0,2 e 2 mmoles.L ⁻¹) depois de 72 horas de privação deste nutriente.....	44
Figura 19. Atividade da Nitrato Redutase nas folhas (A), bainhas (B) e raízes (C) de plantas de arroz (var. Piauí) após retirada da fonte externa de N-NO ₃ ⁻ da solução nutritiva durante 72 h.	45
Figura 20. Teores de N-NO ₃ ⁻ (A), N-Amino (B), açúcares solúveis (C) e N-NH ₄ ⁺ (D) nas folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz (var. Piauí) após retirada da fonte externa de N-NO ₃ ⁻ da solução nutritiva durante 72h. # Percentagem de redução do teor de NO ₃ ⁻ relativo ao valor inicial (0 h).	46
Figura 21. Atividade das P-H ⁺ -ATPases (A), V-H ⁺ -ATPases (B) e H ⁺ -PPases (C) nas raízes e bainhas de plantas de arroz (var. Piauí) após retirada da fonte externa de N-NO ₃ ⁻ da solução nutritiva durante 72 h.	48
Figura 22. Massa fresca de raízes (A) e concentração de nitrato nas raízes e bainhas (B) de arroz (var. Caiapó) com suprimento de NO ₃ ⁻ esgotado e com 2 mmoles L ⁻¹ de NO ₃ ⁻ em solução nutritiva durante 72 h.....	49
Figura 23. Atividade das V-H ⁺ -ATPases e teores de açúcares solúveis. Visualização de uma correlação negativa entre essas variáveis. (A)-médias com desvios e (B)-regressão linear.....	51
Figura 24. SDS-PAGE de proteínas isoladas de membranas do tonoplasto nas raízes de plantas de arroz (var. Piauí) depois de retirada da fonte externa de N-NO ₃ ⁻ da solução nutritiva durante 72 h. *M=Marcador.....	52
Figura 25. Atividade das P-H ⁺ -ATPases nas raízes de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 em presença de 2 mmoles L ⁻¹ de N-NO ₃ ⁻ e após tratamento com 48h de privação de NO ₃ ⁻ em solução nutritiva.....	54
Figura 26. Atividade das H ⁺ -PPases (A) e V-H ⁺ -ATPases (B) nas raízes e bainhas de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 na presença de 2 mmoles L ⁻¹ de N-NO ₃ ⁻ e após tratamento com 48h de privação de NO ₃ ⁻ em solução nutritiva.....	55
Figura 27. Demonstração do efeito do NO ₃ ⁻ sobre a acidificação da rizosfera de plantas de arroz, variedade Piauí.....	57

LISTA DE SÍMBOLOS

ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumine)
DAG	Dias Após a Germinação
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N',tetraacetic acid
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
Fd	Ferredoxina
GS	Glutamina Sintetase
P-H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase de plasmalema
V-H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase de vacúolo
H ⁺ -PPase	Pirofosfatase translocadora de prótons
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System)
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (Low Affinity Transport System)
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida
NR	Nitrato Redutase
NIR	Nitrito Redutase
NRT1	Família de genes para os transportadores de NO ₃ ⁻ de baixa afinidade
NRT2	Família de genes para os transportadores de NO ₃ ⁻ de alta afinidade
PMSF	Polimetilssulfonil fluoreto
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) hemisodium salt
BTP	1,3-Bis[Tris(hydroxymethyl)methylamino]propane
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico
PPi	Pirofosfato

RESUMO

SANTOS, Leandro Azevedo. **Absorção e remobilização de NO_3^- em arroz (*Oryza sativa* L.): Atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo.** Seropédica-RJ, UFRRJ, 74f. (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo).

O metabolismo de nitrogênio em arroz (var. Caiapó) foi estudado por esgotamento do conteúdo de nitrato em cultivo hidropônico. Trinta dias após a germinação (DAG) metade dessas plantas continuou a receber a solução nutritiva, enquanto o outro grupo foi mantido sem troca de solução e monitorado até o esgotamento do NO_3^- . A depleção do NO_3^- resultou em maior queda da atividade da Nitrato redutase nas raízes do que nas folhas e bainhas. As maiores reduções nos teores de NO_3^- foram observadas nas bainhas, indicando ser este compartimento o alvo preferencial para a remobilização. Sob 2mmoles.L^{-1} de nitrato as bainhas apresentam maior acúmulo de N-NO_3^- . Após 72 h há queda acentuada do N-total das bainhas. Os resultados indicam claramente que as bainhas são os sítios preferenciais para o acúmulo, reserva e remobilização de N nesta variedade de arroz. A dinâmica da absorção de NO_3^- foi estudada nas variedades Piauí e IAC-47. Trinta dias após germinação, as plantas ficaram sem N por 72 horas e depois foram repostas soluções com $0,2$ ou 2mmoles.L^{-1} de N-NO_3^- . As coletas foram feitas às 0, 6, 24 e 48 horas. A variedade Piauí mostrou C_{min} inferior a variedade IAC-47. Nota-se na dose de 2mmoles.L^{-1} , que o influxo aparente de NO_3^- é superior a extrusão de prótons, com elevação do pH. Plantas da variedade Piauí apresentam as maiores atividades da NR e GS e acumulam mais NO_3^- nas raízes quando comparada a IAC-47 nas duas doses de N. Acumular e reduzir NO_3^- nas raízes é uma maneira de evitar um gasto energético para o envio deste nutriente para a parte aérea. Isso resultaria em uso mais eficiente de esqueletos de carbono. Não houve grandes variações na atividade das P-H^+ -ATPases nas raízes e bainhas das duas variedades nesta fase de desenvolvimento, indicando que esta proteína deve participar apenas no controle do pH citosólico afetado pela absorção de NO_3^- . Experimentos independentes com as variedades Piauí (tradicional), IAC-47 (melhorada) e Caiapó (desenvolvida para terras altas) foram realizados para estudar a dinâmica de remobilização do nitrato. O suprimento de N-NO_3^- foi cortado aos 30 dias após germinação e coletas foram realizadas às 0, 24, 48 e 72 horas para a variedade Piauí e Caiapó e às 0 e 48 horas para a variedade IAC-47. N-NO_3^- , N-NH_4^+ e N-amino diminuem, mas os teores de açúcares solúveis não diferem entre 0 e 48 horas para as variedades Piauí e IAC-47. Foi possível notar no experimento com a var. Piauí uma correlação negativa entre a atividade das V-ATPases e os teores de açúcares solúveis nas raízes e bainhas, sugerindo que a remobilização do NO_3^- do vacúolo altera o status de energia na planta. Após a supressão do N, houve aumento na atividade das V-ATPases preferencialmente nas raízes para a var. Piauí e nas bainhas para IAC-47, resultando numa maior quantidade de NO_3^- remobilizado por esta última variedade. O aumento na atividade das H^+ -PPases e P-ATPases observada apenas na var. Piauí pode ser produto do metabolismo para o crescimento radicular observado no ensaio realizado com a var. Caiapó. Análise em SDS-PAGE da fração tonoplástica da var. Piauí mostra um aumento na quantidade de proteínas com tamanho de 73 e 67 kDa que são atribuídas às H^+ -PPases e V-ATPases.

Palavras chave: Absorção de nitrato, remobilização de nitrato, bombas de prótons.

ABSTRACT

SANTOS, Leandro Azevedo. **Uptake and remobilization of NO_3^- in rice (*Oryza sativa* L.): Proton pumps activity and dynamics of the process.** Seropédica-RJ, UFRRJ, 74f. (Dissertation, Master Science in Agronomy, Soil Science).

The nitrogen metabolism of rice (Caiapó variety) was studied under nitrate starvation in hidroponic culture. Thirty days after germination half of the plants continued to receive the nutrient solution, while the other group was maintained without solution change and monitored until the exhaustion of NO_3^- . The depletion of NO_3^- resulted in greater decrease of the nitrate reductase activity in the roots than in the leaves and sheaths. The largest reductions in the NO_3^- tissue content was observed in the sheaths, indicating this compartment to be the preferential site for remobilization. Under 2mmoles.L^{-1} of NO_3^- sheaths show great accumulation of this nutrient. After 72 h there is great decrease of the N-content in sheaths. These results indicate clearly that the sheaths are the preferential site for accumulation, store and remobilização of NO_3^- in this rice variety. The dynamics of NO_3^- uptake was studied in Piauí and IAC-47 varieties. Thirty days after germination, plants were kept without N for 72 hours. After that nutrient solution was restored with 0.2 or 2 mmoles.L^{-1} of NO_3^- . The harvests were made at 0, 6, 24 and 48 hours. The Piauí variety showed lower C_{min} than IAC-47. At 2 mmoles.L^{-1} , the apparent influx of NO_3^- was higher than the proton extrusion, increasing the pH. Plants of the Piauí variety showed a greater NR and GS activity in the roots if compared with IAC-47 in the two NO_3^- concentrations. Nitrate accumulation and reduction in the roots is a way to avoid waste of energy, sending this nutrient to leaves and sheaths. That would result in more efficient use of carbon. There were no great variations in the P-H^+ -ATPase activities in the roots and sheaths of the two varieties at this development stage, indicating that this protein should only participate in the cytosolic pH control if affected by NO_3^- uptake. Independent experiments with the varieties Piauí (Landrace), IAC-47 (Improved) and Caiapó (Bred for upland) were made to study the dynamics of nitrate remobilization. The supply of NO_3^- was suppressed 30 days after germination and harvests were made at 0, 24, 48 and 72 hours for the Piauí and Caiapó variety and 0 and 48 hours for the IAC-47 variety. N- NO_3^- , N- NH_4^+ and N-amino decreased, but the content of soluble sugar did not show difference between 0 and 48 hours for the varieties Piauí and IAC-47. In the experiment with Piauí variety it was possible to see a negative correlation between V-ATPase activity and soluble sugars in roots and sheaths, suggesting that nitrate remobilization change the energy status of the plants. After suppression of N, there was an increase in the V-ATPase activity, preferentially in the roots of the Piauí variety, and in the sheath of the IAC-47, resulting in a great amount of NO_3^- remobilization in the IAC-47 variety. The increase in the H^+ -PPase and P-H^+ -ATPase activities only observed in the Piauí variety may be a product of root growth metabolism as was showed in the experiment with the Caiapó variety. SDS-PAGE analysis of the tonoplast root fractions of the Piauí variety shows an increase of proteins bands at 73 and 67 kDa agreeing with the observed activities of PPases and H^+ -ATPases.

Key words: Nitrate uptake, nitrate remobilization, proton pumps.

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um dos cereais mais importantes para o homem, e se constitui na alimentação básica para mais de três bilhões de pessoas. Além da sua importância econômica, estudos com arroz evoluíram de tal maneira que a espécie foi indicada como a planta modelo em pesquisas genômicas, representado as monocotiledôneas (IZAWA & SHIMAMOTO, 1996), devido ao genoma do arroz ser um dos menores na família das gramíneas (440 Mbp) e por sua íntima relação com os principais cereais: aveia, milho, sorgo, trigo e cevada (SANDHU & GILL, 2002; BENNETZEN & MA, 2003).

De todos os elementos minerais requeridos pelas plantas, o N é necessário em maiores quantidades e mais freqüentemente limita o crescimento. O nitrogênio (N) está presente no solo em diferentes formas, onde amônio (NH_4^+), nitrato (NO_3^-), aminoácidos, peptídeos solúveis e outras formas complexas insolúveis podem ser encontradas. No entanto, este nutriente é absorvido principalmente na forma inorgânica como NO_3^- ou NH_4^+ através do sistema radicular. O nitrogênio é um constituinte mineral que se integra a compostos de carbono, dando origem a diversas proteínas estruturais, ácidos nucleicos, aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas e hormônios vegetais e muitos outros componentes celulares importantes, como as membranas. Portanto, a deficiência desse nutriente pode implicar em decréscimo do crescimento vegetativo e rendimento nos cultivos. Plantas deficientes em N apresentam sintomas facilmente perceptíveis como a redução de crescimento, clorose das folhas mais velhas, podendo levar a abscisão dessas folhas e até a morte da planta (TAIZ & ZEIGER, 2004; WILLIAMS & MILLER, 2001).

Atualmente, problemas relacionados ao custo destes fertilizantes nitrogenados e a poluição por nitrato (NO_3^-) têm levado à seleção de variedades vegetais que absorvam e metabolizem o nitrogênio (N) do solo mais eficientemente.

A forma de nitrogênio absorvida pelas plantas é determinada principalmente pela sua abundância e acessibilidade, o que faz do NO_3^- e do NH_4^+ as formas de N mais importante para nutrição das plantas sob condições de cultivo (WIRÉN et al., 1997).

O nitrato é considerado a fonte de N mineral mais importante para o crescimento das plantas em solos bem aerados. Uma vez no interior da célula, o NO_3^- absorvido pode ser reduzido a NO_2^- e depois a NH_4^+ , armazenado no vacúolo ou exportado pelos vasos condutores para as regiões de consumo na parte aérea. A primeira etapa da assimilação do NO_3^- ocorre no citosol pela ação da enzima Nitrato Redutase (NR) que catalisa a redução do NO_3^- a NO_2^- com gasto de poder redutor na forma de NAD(P)H. O NO_2^- após entrar nos plastídios (proplastídeos em raízes e cloroplastos na parte aérea) é reduzido a NH_4^+ pela ação da enzima Nitrito Redutase (NiR) utilizando ferredoxina reduzida. O NH_4^+ é então incorporado em esqueletos de carbono pelo sistema enzimático GS/GOGAT (Glutamina Sintase/Glutamato Sintase). Novamente no citoplasma, o glutamato sofre transaminações pela ação das enzimas aminotransferases dando origem a outros aminoácidos, que por sua vez darão origem às proteínas (TISCHNER, 2000).

A NR é uma enzima passível de ativação e indução pelo substrato (nitrato) e possui meia-vida curta (em torno de três horas). A diminuição no influxo de NO_3^- , e, portanto da quantidade de NO_3^- no citosol, pode resultar em queda da atividade da NR. Deste modo, o NO_3^- armazenado nos vacúolos constitui-se em uma importante reserva, que pode ser posteriormente remobilizada e utilizada para o metabolismo nitrogenado da planta.

O nitrato absorvido pelas plantas pode ser translocado para a parte aérea, reduzido no citosol ou transportado para o vacúolo através de canais iônicos (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995). O movimento de NO_3^- do citosol para o vacúolo pode ser muito rápido, resultando numa depleção do seu conteúdo no citosol mesmo quando o conteúdo de NO_3^- na célula é elevado, sendo, portanto essa organela considerada como o pool de reserva desse nutriente na célula vegetal (ROGRIGUES et al., 2004).

HIREL et al. (2001), sugerem que plantas de milho selecionadas para uma elevada eficiência no uso de N, deveriam possuir uma alta capacidade de absorver o N e armazená-lo nos primeiros estágios de crescimento vegetativo. Estes mesmos autores também sugerem que durante a fase de crescimento vegetativo, essas plantas teriam uma baixa atividade da NR, o que favoreceria o acúmulo de NO_3^- nos tecidos que poderia ser usado no final do ciclo para produção de grãos.

RODRIGUES et al. (2004), trabalhando com duas variedades de arroz, uma tradicional (Piauí) e outra melhorada (IAC-47), verificaram que a cultivar Piauí apresentou aparentemente uma elevada eficiência no uso de N quando comparada com a IAC-47. Estes autores atribuíram o fato à elevada capacidade que a cultivar Piauí apresentou em armazenar o N absorvido no estágio inicial de crescimento e remobilizá-lo no final do ciclo para síntese de proteína nos grãos.

A eficiência para absorção de N em estágios iniciais de desenvolvimento na cultura do arroz pode ser proveniente de um processo adaptativo dessas plantas a ambientes onde a disponibilidade desse nutriente é baixa e ocorre em “fluxos” nas épocas de chuva.

SOUZA et al. (1995), verificaram que variedades de arroz tradicionais são mais eficientes na utilização do N acumulado e, portanto menos dependentes de suplementação externa desse nutriente que variedades melhoradas.

A capacidade de rápido acúmulo de NO_3^- na fase inicial de crescimento pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo de vida, principalmente quando do enchimento dos grãos, e podem ser a razão do alto acúmulo de N nos grãos. A maior eficiência de aquisição de NO_3^- , a partir de baixas concentrações na solução externa pode ser uma indicação de adaptação às condições de estresse nutricional (fluxos instáveis de N), como o decorrente da disponibilidade sazonal de NO_3^- em regiões tropicais.

O NO_3^- é considerado a mais importante fonte de N mineral para o crescimento de plantas em solos aeróbicos. As plantas adquirem NO_3^- da solução do solo, absorvendo-o através de transportadores específicos localizados na membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz.

De acordo com a afinidade do transportador por seu substrato, o transporte de NO_3^- é dividido em dois sistemas, denominados sistemas de transporte de baixa afinidade (LATS - “low affinity transport system”) atuando em concentrações externas superiores a 1 mmol L^{-1} codificado pelos genes da família NRT1, e de alta afinidade (HATS - “high affinity transport system”), que são codificados pelos genes da família NTR2. Os HATS são ainda subdivididos em sistemas constitutivos (cHATS), que operam a baixas concentrações de NO_3^- (em torno de $0,2 \text{ mmoles L}^{-1}$) e induzidos (iHATS) que são induzidos por concentrações externas de NO_3^- muito baixas (SIDDIQI et al., 1990; ASLAM et al., 1992; ASLAM et al., 1993).

O transporte de NO_3^- da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável em termos de gradiente de potencial elétrico e potencial químico, assim, a absorção de nitrato requer energia, presumidamente como uma força próton-motriz, que é proporcionada por bombas eletrogênicas (H^+ -ATPases). Essas enzimas existentes na

plasmalema e no tonoplasto, assim como as H^+ -PPases no tonoplasto, viabilizam a absorção e remobilização de solutos e íons como o NO_3^- (PALMGREN et al., 2001). Assim como para os transportadores, o NO_3^- também atua sobre estas enzimas. SANTI et al. (1995) observaram um aumento na quantidade de H^+ -ATPases e alteração dos parâmetros cinéticos destas enzimas em plasmalema de raízes de milho quando expostas ao nitrato.

Trabalhos anteriores realizados no laboratório de nutrição mineral de plantas da UFRural-RJ demonstraram que um grupo de variedades de arroz, tradicionalmente cultivadas no estado do Maranhão por pequenos produtores, apresenta alta eficiência na utilização de nitrogênio comparado com variedades melhoradas. Estes resultados indicam que estas variedades desenvolveram mecanismos que as tornaram mais eficientes na aquisição e uso deste nutriente resultando em teores e qualidade de proteína nos grãos superiores aos encontrados nas variedades melhoradas.

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

Desta forma, espera-se que alguns dos mecanismos responsáveis por esta eficiência possam ser identificados por meio da análise da atividade das enzimas de assimilação de nitrogênio (Glutamina sintetase – GS e Nitrato Redutase – NR), atividade das bombas de prótons (PM- H^+ -ATPase, V- H^+ -ATPase e V- H^+ -PPase), e teores das frações solúveis de N e de açúcares livres. Através da análise destas variáveis será possível caracterizar a dinâmica de absorção e remobilização de nitrato entre as variedades de arroz, bem como explicar de maneira geral todas as modificações no metabolismo da planta estabelecidas pelos tratamentos.

As hipóteses desta dissertação são de que a dinâmica de acúmulo e remobilização de NO_3^- nas plantas de arroz se dão de maneira diferente para variedades tradicionais e melhoradas. Acreditamos também que o comportamento da atividade das bombas eletrogênicas de H^+ presentes no vacúolo (V-ATPases e H^+ -PPases), pode ajudar no entendimento da dinâmica de remobilização de NO_3^- em arroz.

Não só a remobilização, mas também a dinâmica de absorção de N- NO_3^- pode estar ligada a maior eficiência no uso do nitrogênio. Dessa forma acreditamos que existam diferenças no padrão de absorção de nitrato entre as variedades tradicionais e melhoradas quando comparados os sistemas de alta e baixa afinidade para absorção deste nutriente.

Os objetivos e metas gerais desta dissertação são, portanto, determinar, entre cultivares tradicionais e melhoradas, características relacionadas à eficiência no uso de nitrogênio, identificar características de acúmulo e remobilização de N que possam ser relacionadas a um maior conteúdo de proteína nos grãos de arroz e correlacionar o padrão de absorção e remobilização com a maior eficiência no uso de N pelas variedades de arroz.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Absorção e Transportadores de Nitrato

O nitrato (NO_3^-) é considerado a mais importante fonte de N mineral para o crescimento de plantas em solos aeróbicos. As plantas adquirem NO_3^- da solução do solo, absorvendo-o através de transportadores específicos localizados na membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz.

A absorção de nitrato é um processo ativo, que ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, e precisa da geração de um gradiente de próton através da membrana plasmática, sendo portanto dependente da atividade das bombas de próton (P-H⁺-ATPase) dessas membranas (GLASS et al., 1992).

A absorção de nitrato é realizada por transportadores de alta e baixa afinidade, que são codificados por uma família multigênica. Alguns dos transportadores de nitrato são constitutivos, enquanto outros são induzidos pelo NO_3^- . Altos conteúdos de NO_3^- na parte aérea são positivamente correlacionados com a absorção de NO_3^- e com os níveis de mRNA para transportadores de alta afinidade, sugerindo que altos influxos de NO_3^- são devido ao aumento na expressão dos transportadores.

De acordo com sua afinidade pelo substrato os transportadores de NO_3^- são divididos em dois sistemas, denominados sistemas de transporte de baixa afinidade (LATS – “Low Affinity Transport System”) atuando em concentrações externas superiores a 1 mmol L⁻¹ de NO_3^- e codificado pelos genes da família NRT1, e de alta afinidade (HATS – “High Affinity Transport System”), que são codificados pelos genes da família NTR2. Os HATS são ainda subdivididos em sistemas constitutivos (cHATS), que operam a baixas concentrações de NO_3^- (em torno de 0,2 mmoles L⁻¹) e induzidos (iHATS) que são induzidos por concentrações externas de NO_3^- muito baixas (SIDDIQI et al., 1990; ASLAM et al., 1993).

Onde a concentração externa de nitrato alcança valores acima de 1mmol L⁻¹, o sistema de baixa afinidade começa a operar. O sistema de baixa afinidade está envolvido na absorção de NO_3^- em concentrações externas elevadas, e aparentemente não satura, enquanto os cHATS e iHATS são saturados em baixas concentrações externas de NO_3^- (VIDMAR et. al., 2000).

Assim como ocorre regulação na assimilação do NO_3^- , há também controle na sua absorção. Neste caso, os mecanismos regulatórios atuam principalmente nos transportadores, regulando a entrada do NO_3^- na célula por meio do controle no nível de expressão dos seus genes. Os membros das famílias NRT1 e NRT2 são induzidos em resposta ao NO_3^- no ambiente e são regulados por sinais internos, incluindo metabólitos de nitrogênio e demanda da planta por este nutriente (CRAWFORD & GLASS, 1998).

Estudos já mostraram que a quantidade de mRNA dos genes de iHATS aumenta rapidamente após fornecimento de nitrato a plantas privadas deste elemento (ZHUO et al., 1999). É bem conhecido que o sistema de absorção de NO_3^- de alta afinidade em plantas superiores é rapidamente induzido pela presença externa de nitrato (CRAWFORD & GLASS, 1998). Entretanto, esse tipo de indução já foi verificado também para o sistema de baixa afinidade (WANG et al., 2001).

O fato de que os transportadores de NO_3^- de alta afinidade são induzidos pela exposição ao NO_3^- ou NO_2^- nunca foi explicada satisfatoriamente. Nas tentativas de identificar as moléculas responsáveis pela indução e repressão dos transportadores de N, tem havido pouca discordância de que o NO_3^- é o indutor natural dos transportadores de alta afinidade (GLASS, 2003). Por outro lado, estudos na tentativa de identificar metabólicos responsáveis pela repressão destes tem mostrado que o status de N e o

reservatório interno de NO_3^- não são importantes para sua repressão mas sim os produtos da redução do NO_3^- como NH_4^+ , glutamina e outros aminoácidos (ZHUO et al., 1999).

Quanto ao tempo de indução, sabe-se, pelo menos para o sistema de alta afinidade, que a indução é bastante rápida. Alguns estudos demonstraram indução já a partir da primeira hora de exposição permanecendo até 48 h após a indução inicial. Em milho, foi detectado acúmulo de transcritos do gene *ZmNRT2.1* 0,5 horas após transferência das plantas para solução contendo 1 mmol L^{-1} de NO_3^- .

QUAGGIOTTI et al. (2003) observaram que variedades de milho adaptadas à baixa disponibilidade de nitrogênio, quando sob baixa concentração de NO_3^- no meio externo, mantinham um influxo de NO_3^- maior que variedades melhoradas e ao mesmo tempo essas variedades adaptadas mantinham um nível constante de mRNA para uma H^+ -ATPases, sugerindo que a expressão dessa enzima possibilitaria uma vantagem na absorção de NO_3^- em relação à variedade não adaptada.

Em trabalho com milho HIREL et al. (2001) sugerem que o alto teor de nitrato acumulado nas folhas nos estágios iniciais de crescimento das plantas é um bom indicador da sua capacidade para produzir e acumular N nos grãos e supõem que este é um bom parâmetro para a seleção de plantas com alta eficiência no uso de N. Estes autores sugerem que a formação de reserva de NO_3^- nos vacúolos é um fenômeno controlado geneticamente, e que, além de outros fatores, é dependente de uma baixa atividade da NR na fase vegetativa, e que este NO_3^- pode ser de fundamental importância nas etapas posteriores de assimilação de N e produção de grãos. Estes resultados foram confirmados para arroz, em nosso laboratório (RODRIGUES et al., 2004).

A capacidade de rápido acúmulo de NO_3^- na fase inicial de crescimento pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo de vida, principalmente quando do enchimento dos grãos, e podem ser a razão do alto acúmulo de N nos grãos. A maior eficiência de aquisição de NO_3^- , a partir de baixas concentrações na solução externa pode ser uma indicação de adaptação às condições de estresse nutricional (fluxos instáveis de N), como o decorrente da disponibilidade sazonal de NO_3^- em regiões tropicais.

2.2 H^+ -ATPases de Plasmalema ou P- H^+ -ATPase

Células com grande fluxo de prótons através da membrana plasmática compartilham de importantes características em comum. Com relação à estrutura, células especializadas para transporte são frequentemente caracterizadas por (1) exposição de uma elevada área de superfície para aumentar a interface de absorção, podendo exibir muitas protruções (células epidérmicas) ou invaginações (células de transferência) e (2) apresentam um grande número de mitocôndrias, que serão encarregadas aumentar o suprimento de ATP para viabilizar o transporte ativo. Biofisicamente, células competentes para transporte são caracterizadas por apresentarem (1) uma elevada diferença de potencial de membrana entre a face interna e externa da membrana, tipicamente na faixa de -150 mV a -200 mV , interior negativo; e (2) um exterior ácido, onde o pH apoplástico está tipicamente entre 4 e 5. Assim, através da membrana plasmática, observa-se um gradiente de cargas elétricas e químico (matéria), que é chamado de gradiente de potencial eletroquímico (SONDERGAARD et al., 2004).

A principal bomba iônica em plantas e fungo é a H^+ -ATPases de membrana plasmática. Estas bombas não são encontradas em animais, em que as enzimas equivalentes são as Na^+/K^+ -ATPases, que por sua vez estão ausentes em plantas.

Entretanto, ambos tipos de bombas de prótons são evolucionariamente relacionadas à mesma superfamília das P-H⁺-ATPases (SONDERGAARD et al., 2004).

Em função de uma etapa de fosforilação no seu ciclo catalítico, as P-ATPases são fortemente inibidas por ortovanadato (HVO₄²⁻), um íon análogo ao fosfato (HPO₄²⁻) que compete com o fosfato do ATP pelo sítio de fosforilação do ácido aspártico da enzima. Isso ocorre porque o ortovanadato é muito parecido com a estrutura transicional do fosfato no momento da hidrólise. Devido a esta característica, foi possível o estudo de diversos processos fisiológicos em que as P-ATPases estavam envolvidas, já que sua atividade pode ser isolada com o uso deste inibidor que é específico para esta enzima.

Estas proteínas são reguladas pela concentração de seu substrato, temperatura, pH, íons entre outros, e podem ser reversivelmente ativadas ou desativadas por diversos sinais exógenos como hormônios, luz, ataque de pragas e/ou patógenos, dentre outras. A regulação das P-ATPases é mediada por um domínio auto-inibitório localizado na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica (face citosólica), que atua na regulação da atividade hidrolítica desta proteína. Esta regulação pode também ser resultado da ação de quinases ou fosfatases que podem adicionar ou remover grupos fosfato nos resíduos de serina ou treonina presentes no domínio auto-inibitório da enzima.

A fosforilação destes resíduos e a ligação da proteína regulatória 14-3-3, resulta na ativação da enzima. Este complexo H⁺-P-ATPase-14-3-3 pode ser observado em plantas tratadas com fusicosina, uma toxina produzida pelo fungo *Fusicoccum amygdali*. A fusicosina liga-se ao complexo H⁺-P-ATPase-14-3-3 e o estabiliza, ativando dessa forma irreversivelmente a enzima (KANCZEWSKA et al., 2005) (Figura 1).

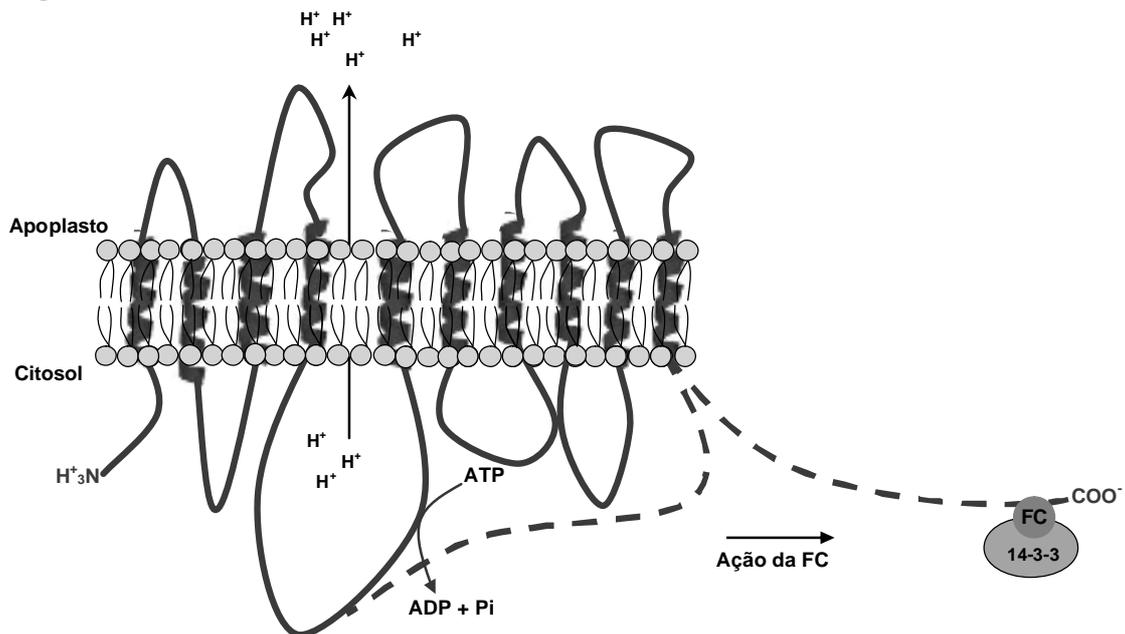


Figura 1. Esquema estendido da P-H⁺-ATPase, mostrando o efeito da fusicocina na ativação irreversível desta proteína.

As bombas de prótons contribuem de maneira crucial para a manutenção de diversos processos fisiológicos nas plantas. Existem evidências de sua participação no controle do ciclo celular, balanço osmótico, e expansão celular via acidificação da parede celular induzida por auxinas (KALAMPANAYL & WIMMERS, 2001). A P-H⁺-ATPase é uma glicoproteína transmembranar com importantes funções no desenvolvimento da célula vegetal. É uma bomba eletrogênica que hidrolisa ATP para

gerar um movimento vetorial de H^+ em direção ao apoplasto. O gradiente de prótons atua como uma força motriz para viabilizar os transportes ativos secundários para dentro ou fora da célula (HU-CHENG et al, 2003).

Diferente das V- H^+ -ATPases, que viabilizam os transportes através da membrana vacuolar e possuem mais de 10 diferentes subunidades, as H^+ -ATPases da membrana plasmática tem como unidade funcional um monômero, embora possa estar organizada na membrana como dímero ou oligômero.

Pelo fato dessas proteínas estarem envolvidas em diversos processos fisiológicos nas plantas, existem muitas isoformas da mesma proteína que podem tanto atuar de maneira tecido-específica como ser ativadas sob determinadas situações em que as plantas são expostas a fatores externos. Estudos moleculares têm mostrado que as P- H^+ -ATPases são codificadas por uma família multigênica dividida em duas subfamílias (SANTI et al., 2003).

O genoma de plantas dicotiledôneas (*Arabidopsis*) e monocotiledôneas (*Oryza sativa*) foi seqüenciado, resultando na identificação de 11 e 10 isoformas das H^+ -ATPases de membrana plasmática respectivamente (BAXTER et al., 2003). Este elevado número de isoformas em plantas pode indicar que algumas bombas têm função redundante, ou a diversidade de isoformas também pode estar relacionada com a natureza multicelular das plantas. Algumas isoformas exibem padrão de expressão tecido- e desenvolvimento-específico e tem ligeiras diferenças bioquímicas e propriedades regulatórias (PALMGREN, 2001).

O transporte do NO_3^- da rizosfera para o citoplasma do córtex celular é termodinamicamente desfavorável tanto em termos de gradiente de potencial elétrico (negativo dentro da célula) quanto em gradiente de potencial químico. A concentração de NO_3^- na solução do solo, que é sujeita a relevantes flutuações, encontra-se na faixa de 0,1 a 5 mM (SANTI et al., 1995). A concentração de NO_3^- no citoplasma das células radiculares expostas a nitrato foi estimada na faixa de 5 a 30 $\mu\text{moles L}^{-1}$ (KING et al., 1992). É portanto claro que sob condições normais, a absorção de NO_3^- requer energia presumivelmente como uma força próton motriz.

SANTI et al. (1995) mostram que vesículas de plasmalema de milho isoladas por gradiente descontínuo de sacarose apresentam uma atividade de P-ATPase duas vezes maior quando expostas a NO_3^- em relação ao controle sem NO_3^- . Estes mesmos autores atribuem este aumento de atividade pelo menos em parte a um aumento na quantidade das H^+ -ATPases da membrana plasmática de raízes de milho.

Em plantas de trevo, YAN et al. (2002) observaram que quando essas plantas foram cultivadas sob baixas concentrações de fósforo ocorria um intenso desenvolvimento de raízes proteóides que levaram a uma grande acidificação da rizosfera, o que ocasiona um aumento na solubilidade do fósforo tornando possível a sua absorção pela planta. Os mecanismos de extrusão de prótons podem criar uma força próton motriz e um gradiente de potencial eletroquímico através da membrana plasmática suficientemente grande a ponto de possibilitar a absorção de potássio em baixíssimas concentrações (em torno de 27 $\mu\text{moles L}^{-1}$) (SCHATCHTMAN & SCHROEDER, 1994), que neste caso ocorre através de transportadores de alta afinidade em simporte com H^+ .

Abaixo segue descrito o movimento do NO_3^- no interior da planta e sua relação com a ação das H^+ -ATPases e H^+ -PPases (Figura 2). O nitrato entra no interior da célula através de transportadores tipo simporte, com dois prótons ($NO_3^-/2H^+$), onde esses H^+ são fornecidos pela ação das P- H^+ -ATPases. O nitrato no interior da célula pode ser então ser reduzido, ou quando em excesso armazenado no vacúolo através de canais iônicos. Da mesma forma como para entrar na célula, o NO_3^- sai do vacúolo através de

transportadores tipo simporte, no entanto, com apenas um próton (NO_3^-/H^+), e esses podem ser fornecidos através da ação da V- H^+ -ATPases e H^+ -PPases.

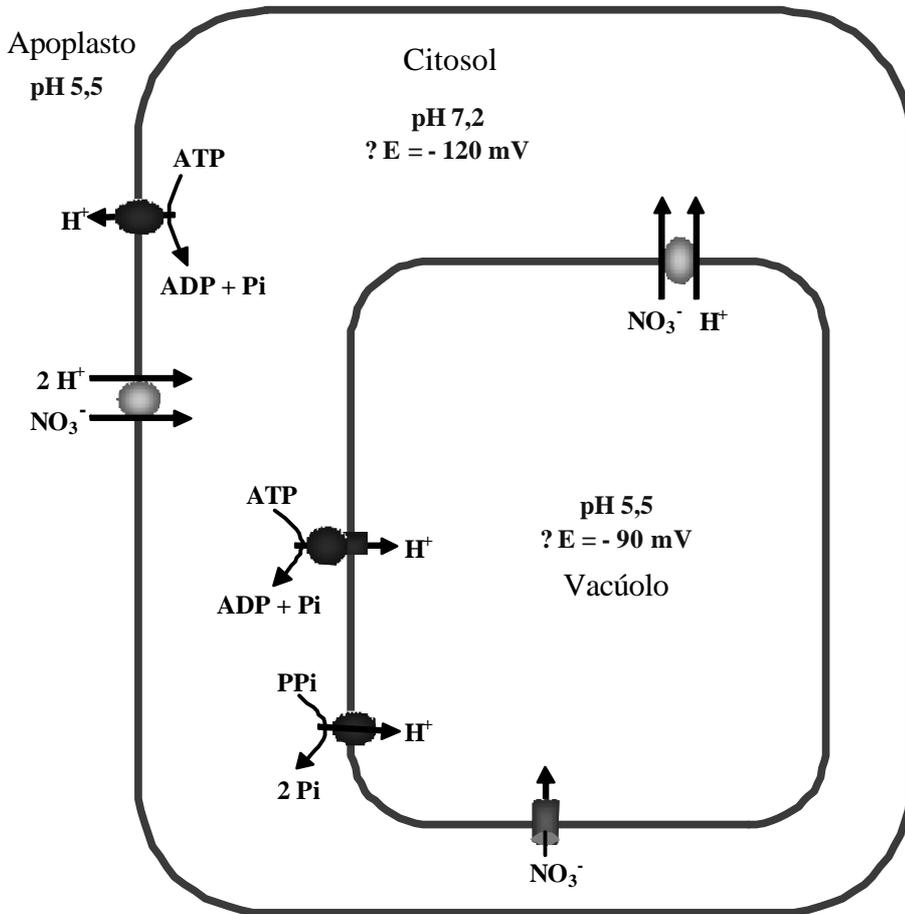


Figura 2. Esquema ilustrativo do movimento do NO_3^- no interior da célula vegetal e sua relação com a ação das bombas de prótons.

2.3 Destino do Nitrato no Interior da Planta

Além de sua importância para a biossíntese de proteínas, o NO_3^- é considerado como um sinal para reprogramar o metabolismo da planta na distribuição de metabólitos essenciais e para acionar mudanças na arquitetura do vegetal (CRAWFORD, 1995).

Após a absorção, o NO_3^- pode ser prontamente reduzido através das enzimas de assimilação do N, pode ser enviado para a parte aérea através do sistema vascular para regiões-dreno desse nutriente, ou pode ser armazenado no vacúolo quanto disponível em excesso. Quantidades razoáveis de NO_3^- pode ser absorvido e acumulado nos tecidos vegetais, sem ser assimilado sob a forma de moléculas orgânicas (HIREL et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004). O NO_3^- que é acumulado nos vacúolos se refere ao compartimento de reserva, enquanto que o NO_3^- presente no citosol forma o compartimento indutor ou metabólico. Nesse compartimento metabólico o NO_3^- é capaz de ativar e induzir a síntese da enzima Nitrato Redutase (NR) (SOLOMONSON & BARBER, 1990).

2.4. Redução e Assimilação do Nitrato

Uma vez no interior da célula, o NO_3^- absorvido pode ser reduzido a NO_2^- , depois a NH_4^+ e incorporado em esqueletos de carbono. Pode também ser armazenado no vacúolo ou exportado pelos vasos condutores para as regiões de consumo na parte aérea.

O NO_3^- absorvido pelas raízes deve ser reduzido a NH_4^+ para que a assimilação possa ocorrer. Essa redução é realizada em duas etapas. As enzimas que catalisam essa redução são: a nitrato redutase (NR; $\text{NO}_3^- \Rightarrow \text{NO}_2^-$) e nitrito redutase (NiR; $\text{NO}_2^- \Rightarrow \text{NH}_4^+$). Para a grande parte das plantas, a maioria da NR envolvida na assimilação usa NADH como poder redutor e é localizada no citoplasma das células radiculares e da parte aérea. A atividade dessa enzima é sujeita a regulação ao nível de expressão gênica e através de complexas modificações pós-transcricionais, envolvendo fosforilação e interação com a proteína 14-3-3 (HUBERT et al., 2002).

A NiR usa Fd como agente redutor e ocorre nos cloroplastos de tecidos fotossintéticos e nos plastídios em raízes e outros tecidos não fotossintéticos. A NiR é regulada através de expressão gênica de maneira similar a NR, mas não possui controle pós-transcricional. As raízes ou parte aérea podem ser os principais locais de assimilação de NO_3^- , dependendo do genótipo e das condições ambientais. Para cereais de clima temperado e leguminosas, a raiz é o principal local de assimilação de NO_3^- em concentrações por volta de 1 mol m^{-3} ou menos, mas a assimilação na parte aérea aumenta significativamente com o aumento da concentração externa de nitrato de 1 para 20 mol m^{-3} (ANDREWS et al., 1992). Por outro lado, vários cereais tropicais, subtropicais e leguminosas apresentam a maior proporção da assimilação do NO_3^- na parte aérea, crescendo em baixas ou altas concentrações externas de NO_3^- .

A assimilação de 1 NO_3^- resulta na geração de $0,67 \text{ OH}^-$, que assim como o H^+ gerado pela assimilação primária do NH_4^+ , pode ser excretado ou neutralizado pelos mecanismos de manutenção do pH citosólico. A maioria do OH^- gerado através da assimilação do NO_3^- nas raízes é exudado para o solo, enquanto que a maior proporção do OH^- gerado na assimilação da parte aérea é neutralizado pela síntese de ácidos orgânicos, em particular, malato (MÜLER et al., 2001).

O NH_4^+ gerado pela redução do NO_3^- , ou absorvido diretamente pela planta pode ser assimilado em aminoácidos primariamente via Glutamina Sintase (GS) / Glutamato Sintase (GOGAT), embora rotas alternativas, como, por exemplo, via glutamato desidrogenase (GDH) e asparagina sintase tenham sido propostas, mas não confirmadas (DUBOIS et al, 2003). No caso da GDH, existem fortes evidências de que a sua principal função é a desaminação do glutamato, produzindo esqueletos de carbono que podem ser adicionados ao ciclo de Krebs (ANDREWS et al., 2004).

A glutamina sintetase catalisa a conversão de glutamato e NH_4^+ para glutamina com gasto de ATP. Existem duas isoformas de GS: a GS citosólica (GS_1), ocorrendo no citosol de raízes e células da parte aérea, e a GS plastídica (GS_2), presente nos tecidos fotossintéticos, plastídios de raízes e outros tecidos não fotossintéticos. Embora exista normalmente somente um gene que codifica para GS_2 , estudos com diversas espécies têm mostrado que GS_1 é codificada por uma família multigênica. Em milho, foi demonstrado que cinco diferentes genes para GS_1 foram expressos em raízes, e que existiu diferença na expressão dentro dos tecidos (LI et al., 1993). No entanto, o papel preciso de cada uma dessas isoformas de GS_1 ainda não é bem conhecido (ANDREWS et al., 2004).

A glutamato sintase (GOGAT), catalisa a conversão de glutamina e 2-oxoglutarato a duas moléculas de glutamato, podendo usar para tanto ferredoxina ou

NADH. Tanto a Fd- quanto a NADH-GOGAT parecem ser localizadas somente em cloroplastos e plastídios, com uma atividade maior da Fd-GOGAT em tecidos fotossintéticos. Dois distintos genes que são diferencialmente expressos nas raízes e folhas foram encontrados para codificar a Fd-GOGAT, enquanto que para NADH-GOGAT, ainda não é claro se existem um ou dois genes (LEA & MIFLIN, 2003).

Nas raízes, o agente requerido para redução do NO_3^- e para a glutamato sintase (GOGAT) é gerado através da via oxidativa das pentoses fosfato. Nas folhas, o ATP e o agente redutor requerido para NiR, GS_2 e Fd-GOGAT são derivados diretamente dos fotossistemas I e II de cloroplastos (sob iluminação). Tem sido proposto, que a assimilação de NO_3^- na parte aérea apresenta vantagem em baixas temperaturas (ANDREWS et al., 2004).

A raiz é o principal local de assimilação primária de NH_4^+ , enquanto que o NO_3^- pode ser assimilado nas raízes ou parte aérea. Nas raízes, a assimilação primária de NH_4^+ (absorvido diretamente ou através da redução do NO_3^-) acontece via GS_1 - GS_2 /NADH-GOGAT, enquanto na parte aérea, GS_2 /Fd-GOGAT é a principal rota de assimilação do NH_4^+ produzido pela redução do NO_3^- .

2.5 Acúmulo de Nitrato nos Tecidos Vegetais

Quando a planta é submetida a uma condição de elevada disponibilidade de N na forma de NO_3^- , parte deste nutriente é reduzido e assimilado, enquanto uma grande quantidade pode ser armazenada nos vacúolos das células de todos os tecidos da planta.

O transporte de NO_3^- do citosol para o vacúolo ocorre através de canais iônicos que operam a uma velocidade muitas vezes superior à dos transportadores. O vacúolo das plantas pode ser considerado o compartimento de reserva do NO_3^- nos tecidos vegetais.

A regulação do conteúdo e volume dos vacúolos nas células das plantas depende da atividade coordenada de transportadores e canais localizados no tonoplasto (membrana vacuolar). As três proteínas de maior abundância do tonoplasto são duas bombas de prótons vacuolares (H^+ -V-ATPase e H^+ -V-PPase) e as aquaporinas (MAESHIMA, 2001).

O vacúolo central é o maior compartimento da célula madura das plantas e pode ocupar mais que 80% do volume total da célula. Entretanto, novas descobertas indicam que ao lado do vacúolo central, podem existir vários pequenos vacúolos. Estes vacúolos freqüentemente pertencem a diferentes classes e podem ser distinguidas através dos seus conteúdos em proteínas solúveis ou por diferentes tipos de uma proteína de membrana vacuolar abundante, as aquaporinas (MARTINOIA et al., 2000).

O movimento seletivo e a redistribuição de íons e moléculas orgânicas pequenas são essenciais para o crescimento e homeostase celular. Assim, as plantas possuem numerosas proteínas envolvidas na facilitação do transporte de minerais, açúcares, metabólitos, e outros compostos através dos limites da membrana de células e organelas (BUCANAN, 2000).

As células eucarióticas possuem extensas membranas internas que separam o componente citoplasmático do extraplasmático. As organelas da via secretória, como os retículos endoplasmáticos, complexos de golgi, lisossomos, e o vacúolo são unidos pelo tráfego de vesículas que também envolve a membrana plasmática. Nas plantas particularmente, devido ao seu tamanho, o vacúolo ocupa a maior parte do volume celular. Esta organela contém uma maquinaria de transporte da via secretória, com um papel muito importante na resposta da planta a vários regimes de estresse (DIETZ et al., 2001).

O NO_3^- acumulado pode ser remobilizado no vacúolo, quando o seu conteúdo citoplasmático diminuir ou quando a planta o exigir em maiores quantidades para os processos de biossíntese na fase de crescimento vegetativo intenso.

Todas as células eucarióticas apresentam uma rede de organelas circundadas por membranas que diferem na função intracelular que realizam. Todas precisam ser energizadas de alguma maneira e, para a membrana celular, esta energização ocorre através da atividade de bombas eletrogênicas (TEODORO, 2004).

O transporte de íons NO_3^- do vacúolo para o citosol ocorre através de um simporte com um próton (NO_3^-/H^+), e para isso um gradiente de potencial eletroquímico deve ser criado de dentro para fora do vacúolo (FERNANDES, 1995). A acidificação de compartimentos intracelulares por uma bomba protônica tipo-V (V-ATPase) é responsável pela energização do transporte de íons e outros metabólitos (PADMANABAN et al., 2004).

Duas distintas bombas protônicas foram encontradas na membrana vacuolar (tonoplasto) de plantas, V-ATPase e H^+ -PPase, ambas enzimas contribuem para gerar um gradiente de potencial eletroquímico de H^+ usando energia derivada da hidrólise de ATP e PPi respectivamente. É freqüentemente aceito que as V-ATPases apresentam papéis predominantes na manutenção do gradiente eletroquímico transmembrana de prótons, entretanto, as H^+ -PPases parecem servir como um sistema auxiliar no bombeamento de prótons, principalmente em tecidos mais jovens onde a produção de PPi é mais intensa (FAÇANHA & MEIS, 1998).

2.6 Remobilização do Nitrato Acumulado

O NO_3^- armazenado no vacúolo das células do tecido vegetal pode ser disponibilizado para assimilação durante períodos onde o suprimento externo de N se torna limitante. Dessa forma o vacúolo funciona como um reservatório de N-NO_3^- para sustentar os processos de crescimento em condições de deficiência desse nutriente.

A remobilização do nitrato do vacúolo para o citosol se dá à custa de energia metabólica através do acionamento de duas bombas de prótons presentes na membrana do tonoplasto, as V- H^+ -ATPases e as H^+ -PPases. A estequiometria deste processo é de $1\text{NO}_3^-/1\text{H}^+$, enquanto que para absorção é de $1\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$. Quando o NO_3^- está presente em grandes concentrações no citosol, ele funciona como um ânion caotrópico para as V-ATPases, causando um desligamento entre os domínios integral e periférico desta proteína tornando-a incapaz de hidrizar ATP e translocar prótons (FINBOW et al., 1997). Dessa forma as V-ATPases não funcionam quando há grandes quantidades de NO_3^- no citosol, priorizando desta forma o acúmulo deste nutriente.

Alguns autores sugerem que a taxa de transporte de NO_3^- do vacúolo para o citosol é proporcional à concentração deste íon no interior do vacúolo e que a remobilização segue cinética de primeira ordem (MACDUFF et al., 1989).

2.7 H^+ -ATPase Vacuolar (EC 3.6.1.3)

A V-ATPase acidifica compartimentos intracelulares e é essencial para muitos processos, incluindo cotransportes, movimento das células guarda, desenvolvimento, e tolerância a estresses ambientais. SZE et al. (2002), identificaram pelo menos 26 genes codificando subunidades da V-ATPase no genoma de *Arabidopsis thaliana*, muito embora a nomenclatura desses genes cause confusão. Estes mesmos autores propõem uma simples nomenclatura para identificar as subunidades dessa holoenzima.

Tabela 1. Nomenclatura proposta para os genes das subunidades da V-ATPase e proteínas em plantas.

Função da Subunidade	Referencia em fungos		Novo nome ^a	Arabidopsis		
	kDa	Gene	Gene ou proteína	kDa	Proteína	
V₁ - Setor periférico						
A	Sítio catalítico do ATP	69	VMH1	VHA-A	68	Periférica
B	Sítio não catalítico do ATP	60	VMH2	VHA-B	54	Periférica
C	Estabiliza atividade do V ₁	42	VMH5	VHA-C	42	Periférica
D	Haste central, acoplamento	32	VMH8	VHA-D	29	Periférica
E	Haste central ou periférica	27	VMH4	VHA-E	26	Periférica
F	Ponte de contato V ₁ -V _o	14	VMH7	VHA-F	14	Periférica
G	Acoplamento do V ₁ ao V _o	13	VMH10	VHA-G	12	Periférica
H	Regulação	54	VMH13	VHA-H	50	Periférica
V₂ - Setor membranar						
a	Acoplamento, junção	95-101	VPH1/STV1 ^b	VHA-a	89-95	Integral, 6-7 TM
c	Translocação de prótons	16	VMH3	VHA-c	16	Integral, 4 TM
c'	Translocação de prótons	17	VMH11	-	ND	-
c''	Proteolípídeo similar ao c	23	VMH16	VHA-c'	18	Integral, 5 TM
d	Montagem do V _o , estabilidade	36	VMH6	VHA-d	40	Periférica
e		-	ND	VHA-e	~ 8	Integral, 2 TM

^a Novo nome sugerido para V-ATPase pode ser aplicado para plantas e animais

Genes de *Arabidopsis thaliana* poderia ser denotado como AtVHA-x.

^b VPH₁ e STV₁ são homólogos a subunidade a em fungos.

Abreviações: ND, não detectado. TM, domínio transmembrana.

Fonte : SZE et al. (2002).

As V-ATPases localizadas na endomembranas (tonoplasto, retículo endoplasmático, complexo de golgi etc.) são uma família de bombas de prótons ATP-dependente responsáveis pela acidificação de compartimentos intracelulares de células eucarióticas. A V-ATPase é composta de dois domínios estruturais. O domínio periférico (V₁) é um complexo de 640 kDa responsável pela hidrólise de ATP e contém oito diferentes subunidades (A-H) de massa molecular entre 13 e 70 kDa com a estequiometria A₃B₃CDEF₂G₂H₁₋₂. O domínio integral (V_o) é um complexo de 260 kDa responsável pela translocação de prótons e é composto de cinco subunidades (a, b, c, c', c'') com massa molecular entre 17 e 100 kDa na estequiometria abc'c''c₄ (KAWASAKI-NISHI et al., 2003).

A V-ATPase é a bomba de H⁺ dominante nas endomembranas da maioria das células vegetais, tanto em termos de quantidade de proteína como também frequentemente em atividade. Sob condições de estresse como salinidade, déficit hídrico, frio, estresse ácido, anoxia e excesso de metais pesados nos solos, a sobrevivência da célula depende fortemente da manutenção ou ajuste da atividade das V-ATPases (DIETZ et al., 2001).

No tonoplasto, a V-ATPase é a proteína mais abundante, ocorrendo na faixa de 6,5 a 35% do total de proteínas presentes no tonoplasto de diferentes espécies de plantas (RATAJCZAK, 2000). A V-ATPase usa a energia liberada durante a hidrólise do ATP para bombear prótons para o interior do lúmen vacuolar, portanto criando um gradiente de potencial eletroquímico, e a força próton motriz para uma variedade de eventos de transporte de íons e metabólitos. Assim, a V-ATPase é extraordinariamente importante com uma enzima “house-keeping” para manutenção da homeostase iônica citosólica e do metabolismo celular.

2.7.1 A V-ATPase e sua relação com a F-ATPase

A V-ATPase é estruturalmente relacionada às F-ATPases (ou F1Fo ATP-sintase) que normalmente funcionam na síntese de ATP em mitocôndrias, cloroplastos e bactérias. A relação entre as V-ATPases e F-ATPases é evidente tanto na estrutura global da holoenzima quanto na seqüência de certas subunidades (KAWASAKI-NISHI et al., 2003). Eletromicrografias têm revelado uma estrutura global similar entre as duas proteínas, com um domínio periférico ligado ao domínio integral da membrana por hastes centrais e periféricas. Acredita-se que estas hastes possuam um importante papel no mecanismo pelo qual esta enzima catalisa o transporte de prótons ATP-dependente.

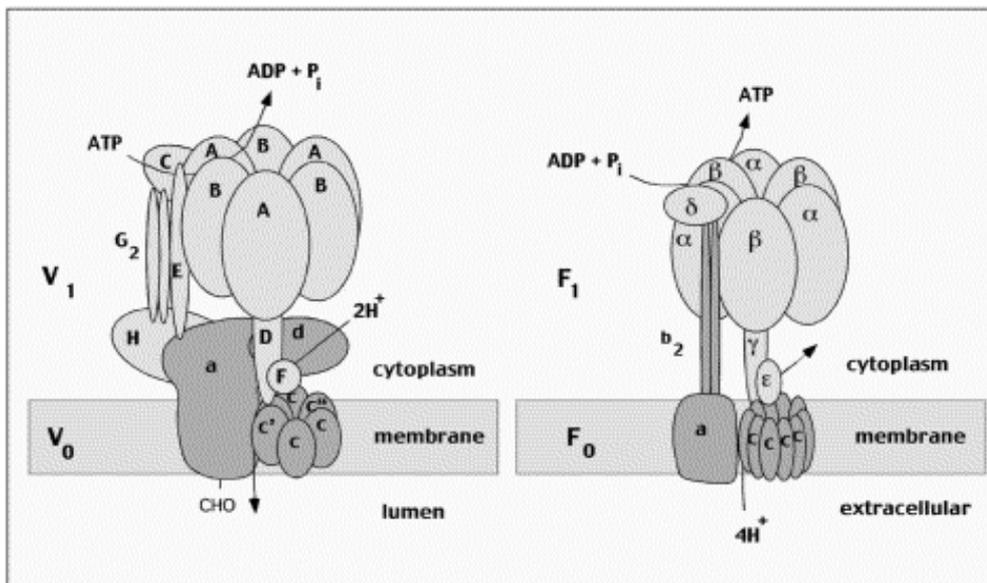


Figura 3. Modelo estrutural das V-ATPases e comparação com as F-ATPases. Fonte: KAWASAKI-NISHI et al. (2003).

A V-ATPase é composta de um domínio periférico V₁ responsável pela hidrólise de ATP e um domínio integral responsável pela translocação de prótons. Os domínios correspondentes para as F-ATPase são F₁ e F_o. O local de ligação do nucleotídeo está localizado sobre a subunidade A e B do domínio V₁, com a catálise ocorrendo primariamente sobre a subunidade A.

A translocação de prótons ocorre na interface da subunidade a e do anel proteolípídico das subunidades (c, c' e c''). Os domínios V₁ e V_o são conectados por hastes centrais (compostas pelas subunidades D e F) e hastes periféricas (compostas pelas subunidades C, E, G e H). Estas hastes possuem uma função crucial no proposto mecanismo rotatório do transporte de prótons mediado pela hidrólise de ATP.

A hidrólise de ATP no domínio V_1 transmite uma força rotacional às hastes compostas pelas subunidades D e F que por sua vez transmite essa mesma força rotacional ao anel proteolípídico composto pelas subunidades (c, c' e c'') que faz contato com a subunidade a no domínio V_1 . A subunidade a é mantida relativamente fixa ao domínio V_1 através das hastes periféricas compostas pelas subunidades C, E, G e H. A subunidade a forma dois hemi-canais em comunicação com os lados citoplasmáticos e luminal da membrana.

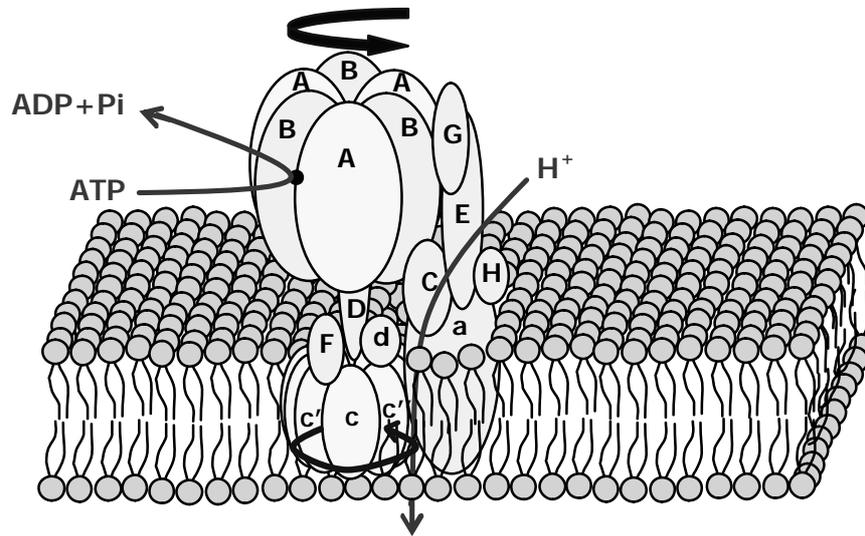


Figura 4. Mecanismo rotatório proposto para translocação de prótons pelas V-ATPases.

2.7.2 Acoplamento da hidrólise de ATP com o fluxo de H^+

A V-ATPase exibe duas atividades distintas que podem ser medidas pela aplicação de diferentes técnicas. A atividade hidrolítica do ATP é calculada pela determinação do fosfato liberado durante a hidrólise do ATP. A atividade de transporte de H^+ pode ser estimada através do monitoramento do decréscimo de fluorescência ou mudanças na absorção da coloração da quinacrine ou “acridine orange” devido à geração do gradiente de prótons com acumulação da coloração no interior das vesículas. Ambas atividades podem ser determinadas simultaneamente num único ensaio aplicando-se o método de Palmgren, usando um sistema enzimático que acopla a hidrólise de ATP com a oxidação de NADH para determinação do consumo de ATP, enquanto a acumulação de H^+ é monitorada pela determinação das mudanças de absorção da sonda acridine orange (RATAJCZAK, 2000).

Estudos realizados através de “patch-clamp” em vacúolos de *Beta vulgaris* mostram evidências de uma estequiometria variável na razão H^+/ATP . Foi observado que a razão, H^+ transportado / ATP hidrolisado decresceu de 3,28 para 1,75 quando o gradiente de pH entre o citosol e o vacúolo aumentou de 2,8 para 4,7 (RATAJCZAK, 2000). O mesmo autor propõe que o baixo número de H^+ bombeados por ATP hidrolisado beneficiaria o transporte de prótons para dentro do vacúolo contra um alto gradiente de H^+ por razões termodinâmicas.

2.7.3 Características da atividade das V-ATPase e inibidores

O pH ótimo para a atividade das V-ATPases está a faixa de 7,5 a 8,0 e pode ser estimulada pelo ânion cloreto (Cl⁻). Tanto as F-ATPases como as V-ATPases são sensíveis ao nitrato, entretanto ao contrário das F-ATPases mitocondriais, a atividade das V-ATPases são insensíveis à azida. Assim, a hidrólise de ATP sensível ao nitrato e resistente à azida é usado para caracterizar a atividade das V-ATPases (RATAJCZAK, 2000).

A atividade das V-ATPases pode ser distinguida de outras bombas de prótons que hidrolisam ATP por sua sensibilidade a diferentes inibidores. As V-ATPase tem sido demonstradas como insensíveis ao vanadato diferentemente das P-ATPases, embora tenham sido identificadas algumas V-ATPases de plantas que são sensíveis a altas concentrações de vanadato, na faixa de 0,5 a 1 mmol L⁻¹ (TEODORO, 2004).

Muitos estudos sobre a função fisiológica dessas proteínas tem sido possíveis graças à presença de inibidores específicos tais com a bafilomicina A₁ e concanamicina. O antibiótico bafilomicina A₁ tem sido demonstrado como um inibidor específico de V-ATPases tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (TEODORO, 2004). Este antibiótico inibe a atividade da V-ATPases de diferentes organismos em concentrações na faixa nanomolar. A bafilomicina A₁ também inibe a atividade da P-ATPase, porém em concentrações muito elevadas na ordem de 10⁻⁵ M, e as F-ATPases são insensíveis a este inibidor (BOWMAN et al., 1988). A ação da bafilomicina A₁ se dá pela ligação desse inibidor ao setor Vo impedindo o fluxo de prótons através do canal de prótons da enzima (CRIDER et al., 1994). KAWASAKI-NISHI et al. (2003), atribui o efeito inibitório da bafilomicina A₁ a uma ligação desta droga à interface das subunidades a e c, impedindo desta forma a rotação do anel proteolipídico.

Embora a inibição das V-ATPases por bafilomicina A₁ seja bastante efetiva, parece que esta inibição pode ocorrer de diferentes maneiras entre as V-ATPases (RATAJCZAK, 2000).

Outro inibidor da V-ATPase é o antibiótico concanamicina A que é mais efetivo que a bafilomicina A₁ com concentração ótima para inibição das V-ATPases em torno de 1/10 da concentração de bafilomicina A₁. A inibição total da V-ATPase por concanamicina A é obtida com concentrações em torno de 10⁻¹⁰ M (TEODORO, 2004).

2.7.4 Distribuição das V-ATPases

Estudos imunquímicos e bioquímicos tem revelado que a V-ATPase não é localizada exclusivamente no tonoplasto de vacúolos maduros, mas é também associadas com o retículo endoplasmático (RE), provacúolos, membrana plasmática, e outras membranas da via secretória (DEITZ et al., 2001). Este mesmo autor diz que a função precisa das V-ATPases nessas membranas, particularmente na membrana plasmática, é objeto de muita especulação. No entanto é necessário ressaltar que a V-ATPase é encontrada principalmente na membrana vacuolar.

A atividade de V-ATPase e PPase estimulada por K⁺ em compartimentos diferentes do vacúolo constitui aproximadamente 50% da atividade hidrolítica encontrada nas membranas totais. Este fato fortalece a idéia de que as V-ATPases e PPases estimuladas por K⁺ estão localizadas e podem estar funcionalmente ativas em uma série de compartimentos e sub-compartimentos da via secretória, além do tradicional compartimento vacuolar (TEODORO, 2004).

2.7.5 Efeito de estresses ambientais sobre a V-ATPase

A V-ATPase é indispensável para o crescimento das plantas sob condições normais devido seu papel na energização dos transportes secundários e manutenção da homeostase de solutos na célula. Sob condições de estresse como salinidade, seca, frio, acidez, anoxia, e excesso de metais pesados no solo, a sobrevivência da célula depende fortemente da manutenção ou ajuste da atividade das V-ATPases (DEITZ et al., 2001).

a) Salinidade

Geralmente, a concentração citosólica de Na^+ não excede a $0,15 \text{ moles.L}^{-1}$, pois uma ampla variedade de reações metabólicas pode ser inibida (WANG et al., 2001).

Os inconvenientes da salinidade para as plantas são dois: o primeiro seria a deficiência hídrica causada pela elevada concentração de sais no solo e a segunda seria o estresse iônico resultante da alteração na relação K^+/Na^+ e na concentração dos íons Na^+ e Cl^- , tóxicos as plantas (BLUMWALD, 2000).

Enquanto o Na^+ pode entrar nas raízes passivamente (movendo a favor de um gradiente de potencial eletroquímico), a remoção do Na^+ do citoplasma pode ser realizada pelo seqüestro para o interior do vacúolo ou pelo transporte através da membrana plasmática para fora da célula (LIN et al., 1997). O gradiente de Na^+ pode ser regulado pela operação de transportadores secundários (antiportes Na^+/H^+) localizados no tonoplasto e na membrana plasmática. Estes sistemas de transporte podem funcionar para remover o Na^+ do citoplasma através da membrana plasmática ou compartimentalizá-lo no lúmen vacuolar. A operação combinada das H^+ -ATPases e antiportes Na^+/H^+ podem permitir o controle do Na^+ citoplasmático.

LIN et al. (1997) estudando estresse salino em algodão sugerem que a atividade das P-ATPases não são a determinante primária na tolerância ao sal, e a atividade dessas proteínas de plasmalema sozinhas são insuficiente para regular os níveis intracelulares de Na^+ . Estes autores chegaram a esta conclusão ao constatar a estimulação das P-ATPases sob condições de estresse salino tanto em variedades de algodão sensíveis ao sal quanto em *Salicornia bigelovii* (planta tolerante à salinidade). Nesta mesma variedade de algodão sensível à salinidade não foi encontrado aumento na atividade hidrolítica das V-ATPases, embora, estudos com plantas tolerantes à salinidade mostrem aumento tanto na atividade quanto na quantidade das V-ATPases. Estes resultados sugerem que a inabilidade das V-ATPases em responder a exposição ao Na^+ pode levar a uma insuficiente força motriz para o transporte de Na^+ (via troca Na^+/H^+) ao interior do vacúolo.

Em plantas halófitas, a salinidade induz a um aumento na atividade e modificações da holoenzima V-ATPase. Tais modificações são observadas em diferentes espécies de plantas e podem até certo ponto ser responsável por mudanças na relação entre o acoplamento da atividade de hidrólise de ATP e transporte de H^+ (RATAJCZAK, 2000).

WANG et al. (2001), em estudos com uma planta halófito (*Suaeda salsa* L.) sob condições de estresse salino, observaram uma regulação positiva da atividade da V-ATPase enquanto a V-PPase possui apenas uma leve contribuição. Estes mesmos autores atribuem o aumento na atividade da V-ATPase não a mudanças estruturais na enzima, mas sim a um aumento na quantidade desta proteína.

O efeito da salinidade sobre as proteínas do tonoplasto tem sido extensivamente estudadas na plantas halófitas e tolerantes à salinidade *Mesembryanthemum crystallinum*. Depois de 8 dias submetidas à alta salinidade, a quantidade de proteína V-

ATPase bem como sua atividade aumentou num fator de 2,5, enquanto que a quantidade e a atividade de V-PPase diminuiu (WANG et al., 2001; RATAJCZAK et al., 1994).

b) Metais pesados

Vários mecanismos celulares como a síntese de fitoquelantes e metalotioneínas estão envolvidos no mecanismo de detoxificação de metais pesados, onde uma função muito importante está reservada para o transporte transmembrana destes metais (DEITZ et al., 2001).

As atividades de antiporte através do tonoplasto requerem um gradiente de prótons, e são então fortemente dependentes da atividade das V-ATPases. Em plantas sensíveis a metais pesados, a atividade de absorção de zinco através do tonoplasto foi reduzida em 42% na presença de bafilomicina, que claramente mostra o papel das V-ATPases no transporte de zinco (DEITZ et al., 2001).

Em estudos com uma cultivar de trigo resistente a alumínio (Al) foi observado que quando esta planta era exposta a estresse de diferentes concentrações deste metal, ocorria tanto um aumento na expressão como na atividade hidrolítica de V-ATPase e F-ATPases. Esta resposta mostrou ser dependente da dose, sugerindo que estas bombas de H⁺ estão envolvidas no mecanismo de tolerância e/ou adaptação ao Al (HAMILTON et al., 2001).

O crescimento de raízes de cevada em meios contendo 5 μmoles L⁻¹ de CdCl₂ ou 5 nmoles L⁻¹ de bafilomicina A₁ foi apenas levemente afetados, no entanto, a combinação de ambas substâncias apresentou um efeito fortemente inibitório ao crescimento radicular. A interpretação deste fenômeno é que a atividade de antiporte de cátion é dirigida por uma força próton motriz criada pelas V-ATPases, que contribui significativamente para a detoxificação do Cd através da compartimentalização vacuolar deste cátion nas raízes de cevada (DEITZ et al., 2001).

2.8 Pirofosfatase Vacuolar ou V-PPase (EC 3.6.1.1)

Prótons pirofosfatasas (H⁺-PPases), são bombas eletrogênicas de prótons que acidificam vacúolos em células vegetais. O substrato para as H⁺-PPases, P_{Pi}, é um subproduto de vários processos metabólicos, como polimerização de DNA e RNA, síntese de aminoacil-tRNA, formação de ADP-glicose e UDP-glicose entre outras (MAESHIMA, 2000).

A H⁺-PPase é composta de um único polipeptídeo com massa molecular em torno de 80 kDa (MAESHIMA, 2000). Quantidades estimadas sugerem que a H⁺-PPase representa em torno de 1 a 10% da proteína total do tonoplasto, enquanto as V-ATPases podem constituir até mais de 30% (TEODORO, 2004).

H⁺-PPase é a única bomba de prótons que possui as três seguintes características. Primeiro, ela consiste num único polipeptídeo com massa molecular de aproximadamente 80 kDa. Segundo, a enzima utiliza um substrato de baixo custo energético, o pirofosfato (P_{Pi}), sendo este, produto gerado por vários processos biosintéticos de macromolécula, como proteína, RNA e celulose. Terceiro, esta eficiente bomba de prótons coexiste com a V-ATPase na mesma membrana vacuolar em células de plantas (MAESHIMA, 2000).

A principal função das V-PPases parece ser na acidificação de vacúolos. Em tonoplasto de *Zea mays L.*, síntese de P_{Pi} foi obtida em resposta a criação de um gradiente de H⁺ pela hidrólise de ATP, bem como síntese de ATP foi obtida em resposta a criação de gradiente de H⁺ pelo P_{Pi} (BALTSCHIEFFSKY et al., 1999).

H⁺-PPase requer Mg⁺² como um cofator necessário para estabilização da atividade enzimática. Altas concentrações de K⁺ podem estimular as H⁺-PPases, enquanto o excesso de PPI, Ca⁺, Na⁺, e F⁻ inibe a sua atividade (SHIMAOKA et al., 2004).

Nas plantas, o transporte de solutos para dentro do vacúolo central é um pré-requisito para o crescimento e expansão celular. Além disso, as plantas têm que manter sua homeostase iônica em diversas condições ambientais, portanto não é surpresa que as endomembranas das plantas possuam um segundo tipo de bomba de prótons, a pirofosfatase (H⁺-PPase) (GAXIOLA et al., 2002). O requerimento diferenciado de energia por estas duas bombas de prótons pode prover a plasticidade necessária para a manutenção da homeostase celular numa ampla faixa de condições metabólicas (DETTMER et al., 2005). Por exemplo, tem sido argumentado que H⁺-PPase é a bomba predominante em tecidos jovens que contém um elevado conteúdo de pirofosfato oriundo das altas atividades biossintéticas desses tecidos. YANG et al. (2003), afirmam que a atividade das V-PPase nas células em crescimento ajuda a conservar o ATP, que é moeda corrente de energia na célula.

As PPases de uma ampla variedade de organismos podem ser divididas em três classes: PPases solúveis, PPase associada à membrana, e H⁺-PPase. Somente a H⁺-PPase entre estes três tipos de PPases tem a habilidade de transportar prótons através da membrana (MAESHIMA, 2000).

2.8.1 Origem do PPI na célula vegetal

A H⁺-PPase, juntamente com a V-ATPase são as principais enzimas envolvidas no transporte de prótons em plantas e utilizam como fonte de energia o PPI e ATP respectivamente. A V-PPase é uma bomba de próton que consiste em um único polipeptídeo, e seu substrato, o pirofosfato (PPI) é um dos compostos de alta energia mais simples (MAESHIMA, 2001).

Muitas vias biossintéticas geram PPI na célula vegetal. Podem ser citados como exemplo a acetilação da coenzima A na síntese de ácidos graxos, a aminoacilação do tRNA na síntese de polipeptídeos, formação de ligações fosfodiéster na síntese de polinucleotídeos, ativação de açúcares na síntese de polissacarídeos, síntese de nucleotídeos e lipídeos, e a formação de fosfosulfato de adenosina a partir de ATP e sulfato (TEODORO, 2004). Segue abaixo descrita as principais rotas para produção de PPI em células vegetais:

Ativação de aminoácidos (aminoacil t-RNA sintetase)

Aminoácido + tRNA + ATP ? aminoacil-tRNA + AMP + **PPI**

Síntese de RNA (RNA polimerase)

(NMP)_n + NTP ? (NMP)_{n+1} + **PPI**

Síntese de DNA (DNA polimerase)

(dNMP)_n + dNTP ? (dNMP)_{n+1} + **PPI**

Formação de ADP-glicose (ADP-glicose pirofosforilase, síntese de amido)

Glicose-1-fosfato + ATP ? ADP-glicose + **PPI**

Formação de UDP-glicose (UDP-glicose pirofosforilase, síntese de celulose e sacarose)

Glicose-1-fosfato + UTP ? UDP-glicose + **PPI**

Ativação dos ácidos graxos na β -oxidação (ácido graxo-acil-CoA sintetase)

Ácido graxo + CoA + ATP ? ácido graxo-acil-CoA + AMP + **PPi**

2.8.2 Estrutura da V-PPase

A V-ATPase de plantas consiste de 761 a 771 aminoácidos, massa molecular em torno de 80 a 81 kDa e tamanho aparente em gel de poliacrilamida de 70 a 73 kDa (MAESHIMA, 2001; TEODORO, 2004). A seqüência de aminoácidos é altamente conservada entre plantas terrestres com 86% a 91% de identidade (MAESHIMA, 2001).

2.8.3 Tamanho funcional das V-PPases

As V-PPases funcionam como um monômero durante a hidrólise de PPi. A massa funcional aproximada das V-PPases determinada por radioinativação está entre 88 e 96 kDa quando a atividade hidrolítica é analisada pós-irradiação, enquanto que o tamanho determinado através da seqüência do seu cDNA é de 81 kDa. O tamanho das V-PPases também determinado por radioinativação para transporte de H^+ está em torno de 290 a 370 kDa, com tamanho de três a quatro vezes maior que o observado apenas para a hidrólise do seu substrato (REA & POOLE, 1993). Estes mesmos autores sugerem que é possível que enquanto subunidades autônomas podem catalisar a hidrólise de PPi, o transporte de H^+ e/ou transdução de energia livre da hidrólise de PPi para o transporte de H^+ através da membrana demanda uma proximidade funcional entre as subunidades.

2.9 Envolvimento do Nitrato nos Processos Fisiológicos das Plantas

O desenvolvimento do sistema radicular de plantas é altamente responsivo a disponibilidade e distribuição de nutrientes no solo (ZHANG & FORDE, 2000). Tem sido sugerido que a assimilação de nitrato leva a um aumento do influxo de fotossintatos e/ou auxina que então estimula o crescimento de raízes laterais neste local de assimilação (STTELMACHER et al., 1993).

A primeira evidência clara do papel do nitrato na regulação do desenvolvimento de plantas vem de estudos realizados com mutantes de *Nicotiana plumbaginifolia* deficientes em nitrato redutase (NR), em que foi mostrado que a acumulação de altas concentrações de NO_3^- na parte aérea correlacionou-se com uma marcante inibição do crescimento radicular (SCHEIBLE et al., 1997). ZHANG & FORDE (1998), encontraram taxas similares de alongamento radicular entre mutantes de *Arabidopsis* sem NR e plantas normais, indicando que a resposta não é dependente da habilidade da planta em assimilar o NO_3^- .

Em milho, o aumento nas taxas e frequência de iniciação do alongamento das raízes laterais associado com um suprimento localizado de NO_3^- foi correlacionado com um aumento no conteúdo endógeno de AIA nas raízes da zona de suprimento do NO_3^- (SATTELMACHER et al., 1993).

Além de estimular o crescimento radicular quando sob suprimento localizado, o NO_3^- também exerce um efeito inibitório sobre o alongamento de raízes laterais (ZHANG et al., 1999; ZHANG & FORDE, 2000). Esta inibição que não afeta as raízes primárias foi primeiro notada quando altas concentrações de NO_3^- (>10 mmol L^{-1}) foram aplicadas ao sistema radicular de *Arabidopsis* (ZHANG & FORDE, 1998). Estes mesmos autores afirmam que existem evidências sugerindo que o acúmulo de nitrato

dentro da planta tem um importante papel na inibição do desenvolvimento de raízes laterais.

Segundo ZHANG e FORDE (2000), existem fortes evidências fornecidas por diversos estudos de que as raízes podem perceber a presença do nitrato no ambiente e usar isto como sinal para modular a expressão de genes. Os genes para NR em plantas são rapidamente induzidos pelo nitrato, sendo esta indução muito rápida (dentro de minutos) e não dependente da síntese de novas proteínas (GOWRI et al., 1992).

Uma forma de nitrato redutase ligada à membrana plasmática (PM-NR) que é bastante distinta da forma citosólica e está localizada na superfície da face externa da membrana plasmática tem sido indicada como um possível sensor de NO_3^- (FORDE, 2002a). Uma nova enzima ligada à membrana que catalisa a redução do NO_2^- a óxido nítrico (NO) foi recentemente descoberta em raízes de tabaco (STÖHR et al., 2001). Este mesmo autor sugere que esta enzima nitrito:NO-redutase pode atuar em conjunto com a PM-NR para converter o NO_3^- externo em NO, que poderia prontamente passar através da membrana plasmática e atuar como um intermediário na sinalização pelo NO_3^- .

Dois genes codificam possíveis componentes da rota de sinal de transdução disparada pelo nitrato externo (Figura 5) (FORDE, 2002a). O primeiro (ANR1) é um gene regulado pelo NO_3^- membro da família MADS-box de fatores de transcrição. Onde a expressão do *ANR1* foi reprimida por antisense ou co-supressão, as linhas transgênicas resultantes não mostraram resposta de desenvolvimento radicular ao suprimento localizado de NO_3^- (ZHANG & FORDE, 1998). O segundo (*AXR4*) é um gene que foi primeiramente identificado como em gene sensível a auxina com uma importante função no gravitropismo radicular. Assim como as linhas transgênicas com a expressão do *ANR1* reprimida, as linhas mutantes de *axr4* não respondem ao tratamento localizado com nitrato (ZHANG et al., 1999), sugerindo uma sobreposição entre a auxina e a rota de resposta ao NO_3^- na regulação do crescimento radicular.

A sinalização pela auxina em raízes de *Arabidopsis* envolve uma atividade mitótica de proteínas cinase (MAPK), sendo a ativação destas proteínas dependente de *AXR4* (MOCKAITIS & HOWEL, 2000).

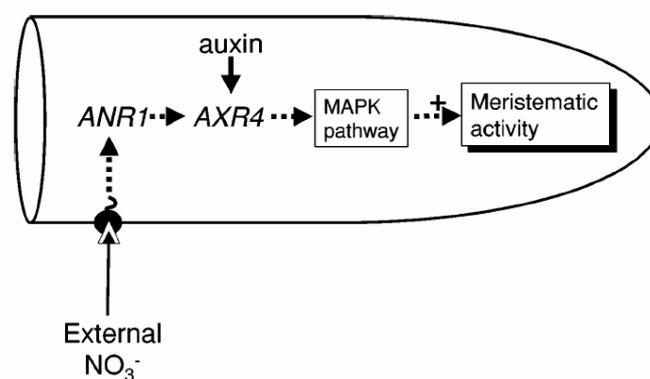


Figura 5. Rota de sinal de transdução induzida pelo suprimento localizado de nitrato estimulando o alongamento de raízes laterais. Copiado de FORDE (2000a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Metabolismo de N em Arroz sob Deficiência de N-NO_3^-

Para estudar a dinâmica do acúmulo e da remobilização de N-NO_3^- , um ensaio foi realizado para caracterizar o metabolismo de nitrogênio em plantas crescidas com suprimento normal de N-NO_3^- , ou na ausência deste íon em solução nutritiva. Plântulas de arroz da variedade Caiapó foram cultivadas em câmara de crescimento submetidas a fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossinteticamente ativos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura $28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ (diurna/noturna).

As sementes de arroz foram colocadas para germinar em potes contendo água destilada, onde uma gaze foi usada como suporte para impedir a imersão das sementes. Uma semana após a germinação as plântulas foram transferidas para potes de 2 litros (10 plântulas por pote), contendo solução de HOAGLAND & ARNON (1954) com 2 mmoles L^{-1} de N-NO_3^- e a $1/4$ da força iônica. Cinco dias depois a solução foi trocada para outra a $1/2$ da força iônica e após mais cinco dias o sistema recebeu solução em força iônica total até os 30 dias após a germinação (DAG) com trocas a cada três dias. A correção do pH foi realizada com H_2SO_4 .

Depois da última troca de solução aos 30 DAG os potes foram divididos em dois grupos: Controle (troca de solução nutritiva com 2 mmoles L^{-1} de N-NO_3^- a cada 3 dias) e Tratamento (sem troca de solução nutritiva). O conteúdo de NO_3^- na solução nutritiva das plantas submetidas ao tratamento foi monitorado a cada 4 h até a 120ª h, e a partir desse momento a cada 2 h até atingir o C_{min} (concentração externa na qual o fluxo líquido de íons é zero). As amostras de solução nutritiva foram acondicionadas em tubos ependoff e o conteúdo de NO_3^- foi determinado pelo método de CATALDO et al. (1975).

A partir do esgotamento de NO_3^- da solução nutritiva, foi iniciado o acompanhamento da remobilização de NO_3^- que se espera tenha sido acumulado pela planta. Para isso foram feitas coletas da parte aérea, caule e raiz às 0, 24, 48 e 72 horas, tanto das plantas controle como do tratamento. Foram também quantificadas a massa fresca de folhas, bainhas e raízes.

Amostras de folhas, bainhas e raízes das plantas de arroz foram coletadas e utilizadas para a determinação da atividade da Nitrato Redutase (JAWORSKI, 1971). Amostras de um grama de material coletado da parte aérea ou raízes foram homogeneizadas em etanol 80%, e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH_4^+ (FELKER, 1977), N-NO_3^- (CATALDO et al., 1975) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957). O restante do material vegetal foi seco para determinação do N-total (TEDESCO et al., 1982).

3.2 Dinâmica de Absorção do Nitrato

Um outro experimento com as variedades Piauí e IAC-47 foi realizado a fim de caracterizar a dinâmica de absorção de N-NO_3^- entre estas variedades contemplando os dois sistemas de absorção. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento submetidas a fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossinteticamente ativos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura $28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ (diurna/noturna).

As plantas foram crescidas em solução de Hoagland com 2 mmoles.L⁻¹ de N-NO₃⁻ até a mesma idade do experimento realizado para o estudo da remobilização.

Depois de 30 DAG as plantas foram privadas de NO₃⁻ na solução nutritiva durante 72 horas, e a partir de então foi reposta a solução com 0,2 ou 2 mmoles L⁻¹ de NO₃⁻ para acompanhamento do processo de absorção as 0, 6, 24 e 48 horas (Figura 6).

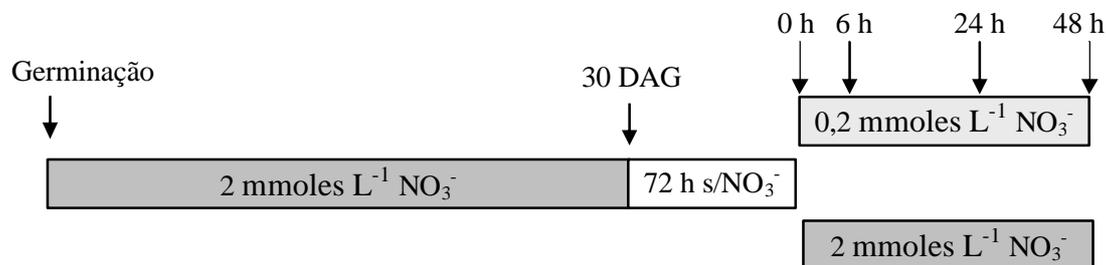


Figura 6. Esquema do experimento realizado para avaliação da dinâmica de absorção de NO₃⁻ entre variedades tradicionais e melhoradas de arroz.

O conteúdo de NO₃⁻ na solução nutritiva foi monitorado em amostras de 0,1 mL, a cada hora até as 12 horas; de duas em duas horas até as 24 horas; e de quatro em quatro horas até o final do experimento às 48 horas. As amostras de solução nutritiva foram acondicionadas em tubos ependorff e o conteúdo de NO₃⁻ foi determinado pelo método de CATALDO et al. (1975).

Amostras de folhas, caules e raízes das plantas de arroz foram coletadas e utilizadas para a determinação da atividade da Nitrato Redutase (JAWORSKI, 1971) e Glutamina Sintetase (FARDEN & ROBERTSON, 1980). Amostras de um grama de material coletado da parte aérea ou raízes foram homogeneizadas em etanol 80%, e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977), N-NO₃⁻ (CATALDO et al., 1975) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

Amostras de cinco a dez gramas de raízes e bainhas foram coletadas para análise da atividade das PM-H⁺-ATPase, utilizando metodologias propostas por GIANNINI & BRISKIN (1987); LIN et al. (1977) e YAN et al. (2002), com modificações.

As metodologias utilizadas para isolamento de vesículas de plasmalema e tonoplasto, quantificação de proteínas, medição de atividade das bombas de prótons e eletroforese das proteínas, estão descritas abaixo.

3.2.1 Isolamento de vesículas de plasmalema e tonoplasto

Todo o processo descrito para o isolamento das vesículas foi realizado de 0 a 4°C. Amostras de caule e raízes (5 a 10 g de massa fresca) foram maceradas em almofariz e pistilo com 10 a 20 mL do meio de extração contendo: Tris-HCl 50 mmoles L⁻¹ (pH 8,0), sacarose 250 mmoles L⁻¹, glicerol 100 mL L⁻¹, KI 150 mmoles L⁻¹, cloreto de colina 100 mmoles L⁻¹, EGTA 2 mmoles L⁻¹, EDTA 2 mmoles L⁻¹, polivinilpirrolidona (PVP) 10 g L⁻¹, fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mmol L⁻¹, ditioneitol (DTT) 5 mmoles L⁻¹, 2-mercaptoetanol 5 mmoles L⁻¹ e 5 g L⁻¹ de albumina. O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e em seguida submetido a uma centrifugação de 3.600 g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e novamente centrifugado a 8.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido e agora centrifugado a 105.000 g por 40 minutos. Descarta-se o sobrenadante e ressuspendeu-se

o precipitado com 2 mL de um meio contendo: Tris-HCl 30 mmol L⁻¹ (pH 7,5), glicerol 150 mL L⁻¹, EGTA 1 mmol L⁻¹, EDTA 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹, DTT 2 mmol L⁻¹ e PMSF 1 mmol L⁻¹. Em seguida este material foi colocado sobre um gradiente de sacarose de 430 g L⁻¹/300 g L⁻¹/100 g L⁻¹ e centrifugado a 105.000g por 2h. 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 105.000 g durante 40 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 1 mL de meio de suspensão. As proteínas foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -25°C para posteriores análises.

3.2.2 Quantificação de proteína

A concentração de proteína foi determinada pelo método de BRADFORD, 1976, usando soro albumina bovina como padrão.

3.2.3 Atividade das PM-H⁺-ATPases, V-H⁺-ATPases e H⁺-PPases

A atividade das bombas de prótons, PM-H⁺-ATPases, V-H⁺-ATPases e H⁺-PPases foram determinadas pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP (PM- e V-H⁺-ATPase) e PPi (H⁺-PPase) como descrito por YAN et al. (2002), com modificações. O meio de reação para a PM-H⁺-ATPase é composto de MOPS-BTP 30 mmol L⁻¹ (pH 6,5), MgSO₄ 5 mmol L⁻¹, KCl 50 mmol L⁻¹, Na₂MoO₄ 1 mmol L⁻¹, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, KNO₃ 50 mmol L⁻¹, NaN₃ 1 mmol L⁻¹ e ATP 5 mmol L⁻¹. O meio de reação para as V-H⁺-ATPases é composto de HEPES-BTP 30 mmol L⁻¹ (pH 7,5), MgSO₄ 5 mmol L⁻¹, KCl 50 mmol L⁻¹, Na₂MoO₄ 1 mmol L⁻¹, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, Na₃VO₄ 0,2 mmol L⁻¹, NaN₃ 1 mmol L⁻¹ e ATP 5 mmol L⁻¹. O meio de reação para as H⁺-PPase contém HEPES-BTP 30 mmol L⁻¹ (pH 7,2), MgSO₄ 5 mmol L⁻¹, KCl 100 mmol L⁻¹, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, NaN₃ 1 mmol L⁻¹ e PPi 1 mmol L⁻¹.

A reação foi iniciada para todas as bombas de H⁺, pela adição de 4 µg de proteína por mL de meio. Após 30 min a 30°C a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL do meio de reação contendo as proteínas e 1 mL do meio de parada contendo H₂SO₄ 20 mL L⁻¹, SDS 50 g L⁻¹ e (NH₄)₂MoO₄ 7 g L⁻¹ previamente em tubos de ensaio submersos em gelo. Em seguida foram adicionados 50 µL de ácido ascórbico 100 g L⁻¹. Após 10 minutos 1,45 mL de um meio contendo 40 g L⁻¹ de citrato de sódio e 20 g L⁻¹ de ácido acético glacial foi adicionado a fim de prevenir a medição do fosfato (Pi) liberado pela atividade residual das H⁺-ATPases e hidrólise ácida do ATP. A cor foi totalmente desenvolvida após 30 min e a leitura espectrofotométrica foi realizada a 820 nm.

Para verificar a ação de inibidores sobre a atividade da P-H⁺-ATPase, foi usado um meio com 0,2 mmol L⁻¹ de Vanadato (Na₃VO₄). A atividade desta proteína foi calculada pela diferença entre a atividade observada sem e com a presença de vanadato no meio de reação. Para verificar a ação de inibidores sobre a atividade da V-H⁺-ATPase, foi usado um meio como o acima descrito, mas contendo 100 µmol L⁻¹ de bafilomicina A₁. A atividade desta enzima foi calculada pela diferença entre a atividade observada sem e com a presença de bafilomicina A₁. A atividade da H⁺-PPase dependentes de K⁺ foi calculada pela diferença entre a atividade observada na ausência e presença de 100 mmol L⁻¹ de KCl no meio de reação. NaF a 2,5 mmol L⁻¹ também foi usado num meio de reação separado para verificar o grau de inibição das H⁺-PPases.

3.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para verificar a quantidade relativa de proteína nas membranas isoladas, foi realizada uma análise de SDS-PAGE como descrito por LAEMMLI (1970). As proteínas de membrana vacuolar (1 µg) foram inicialmente tratadas com tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mmol L⁻¹ pH 6,8, SDS 100 g L⁻¹, glicerol 250 mL L⁻¹, azul de bromofenol 5 g L⁻¹ e mercaptoetanol 50 mL L⁻¹) na proporção de 2:1 (amostra:tampão). As amostras foram aquecidas a 95°C durante 5 min e depois de resfriadas aplicadas em SDS-PAGE constituído de gel de separação (Tris-HCl 125 mmol L⁻¹ pH 8,8, SDS 1 g L⁻¹, acrilamida 100 g L⁻¹, persulfato de amônio 0,5 g L⁻¹ e TEMED 0,1 mL L⁻¹) e gel de empilhamento (Tris-HCl 125 mmol L⁻¹ pH 6,8, SDS 1 g L⁻¹, acrilamida 40 g L⁻¹, persulfato de amônio 0,5 g L⁻¹ e TEMED 0,1 mL L⁻¹). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida contendo glicina 192 mmol L⁻¹, Tris 25 mmol L⁻¹ e SDS 1 g L⁻¹ sob 70V. As proteínas foram coradas com nitrato de prata (CHAVES, 2004).

3.3 Dinâmica de Remobilização do Nitrato

3.3.1 Variedade Piauí

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento no Departamento de Solos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) com uma variedade tradicional de arroz (Piauí) cultivada em solução nutritiva.

As plantas foram submetidas a fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro) com luminosidade de 80 µmol m⁻² s⁻¹ (fluxo de fótons fotossinteticamente ativos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

As sementes de arroz foram colocadas para germinar em potes contendo água destilada, onde uma gaze foi usada como suporte para impedir a imersão das sementes. Uma semana após a germinação as plântulas foram transferidas para potes de dois litros (10 plântulas por pote), contendo solução de HOAGLAND & ARNON (1950) com 2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ a ¼ da força iônica, cinco dias depois a solução foi trocada para ½ da força iônica e após mais cinco dias recebeu solução com 5 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ em força iônica total até os 30 dias após a germinação (DAG), com trocas periódicas a cada 2 dias.

No momento da última troca de solução aos 30 DAG as plantas receberam solução nutritiva completa sem N-NO₃⁻ e a partir de então foram realizadas coletas às 0h, 24h, 48h e 72h.

Amostras de folhas, caules e raízes das plantas de arroz foram coletadas e utilizadas para a determinação da atividade da Nitrato Redutase (JAWORSKI, 1971). Amostras de um grama de material coletado da parte aérea ou raízes foram homogeneizadas em etanol 80%, e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-NO₃⁻ (CATALDO et al., 1975), N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH₄⁺ (FELKER, 1977) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

Amostras de três gramas de raízes e bainhas foram coletadas para análise da atividade das V-H⁺-ATPase, H⁺-PPase e P-H⁺-ATPase, utilizando metodologias propostas por GIANNINI e BRISKIN, (1987); LIN et al. (1977); YAN et al. (2002), com modificações, como descrito no item 3.2. As proteínas extraídas no tonoplasto foram utilizadas para análise em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

Para verificar quais os efeitos das condições experimentais sobre o crescimento radicular, um outro experimento foi feito, usando-se a variedade Caiapó, planta recomendada para cultura de sequeiro, em ambiente semelhante ao usado para a cultura da variedade Piauí. Plantas da variedade Caiapó foram cultivadas como descrito acima. Aos 30 DAG, as plantas foram divididas em dois grupos: Controle, com troca de solução nutritiva (2 mmol L^{-1} de N-NO_3^-) a cada três dias, e Tratamento (sem troca de solução nutritiva). A partir do esgotamento de NO_3^- da solução nutritiva, foram feitas coletas da parte aérea e raiz, às 0, 24, 48 e 72 horas. Amostras de um grama de raízes e bainhas foram coletadas para determinação de N-NO_3^- (CATALDO et al., 1975). Foi também determinada a massa fresca de raízes.

3.3.2 Variedade IAC-47

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento em condições idênticas as utilizadas para a variedade Piauí. No entanto, neste experimento foram realizadas coletas apenas as 0 e 48 h depois da adição dos tratamentos. Amostras de um grama de material coletado da parte aérea ou raízes foram homogeneizadas em etanol 80%, e após partição com clorofórmio (FERNANDES, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-NO_3^- (CATALDO et al., 1975), N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH_4^+ (FELKER, 1977) e açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

Amostras de três gramas de raízes e bainhas foram coletadas para análise da atividade das V-H^+ -ATPase, H^+ -PPase e P-H^+ -ATPase, utilizando metodologias propostas por GIANNINI e BRISKIN, (1987); LIN et al. (1977); YAN et al. (2002), com modificações.

3.4 Efeito do KNO_3 sobre a Atividade das P-H^+ -ATPases

A atividade de extrusão de prótons pelas raízes foi determinada de acordo com RÖMHELD et al., (1984). As raízes de plantas de arroz da variedade Piauí com 2 semanas após germinação e crescidas em água deionizada, foram imersas numa solução geleificada contendo agar $7,5 \text{ g L}^{-1}$, púrpura de bromocresol $0,06 \text{ g L}^{-1}$, K_2SO_4 $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e CaSO_4 1 mmol.L^{-1} , pH 6. As raízes foram gentilmente imersas no gel para evitar danos ao tecido. O registro da acidificação rizosférica foi realizado após 3h da imersão das raízes no gel. Para determinação da sensibilidade das P-H^+ -ATPases ao vanadato, foi adicionado a solução 1 mmol.L^{-1} de Na_3VO_4 . Para visualização do efeito do nitrato sobre a acidificação rizosférica foi adicionado a solução 2 mmol L^{-1} de KNO_3 .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Metabolismo de N em Arroz sob Deficiência de N-NO₃⁻

A depleção do NO₃⁻ da solução nutritiva não ocorre de maneira contínua (Figura 7). Nota-se que nas primeiras horas após a última troca de solução há um efluxo de NO₃⁻ para a solução nutritiva. Isto pode estar associado às elevadas concentrações de NO₃⁻ já existentes na planta, decorrentes do cultivo permanente com 2 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ e trocas a cada três dias. O fato é que o efluxo ocorre no período da noite, onde não há formação de fotoassimilados pela planta.

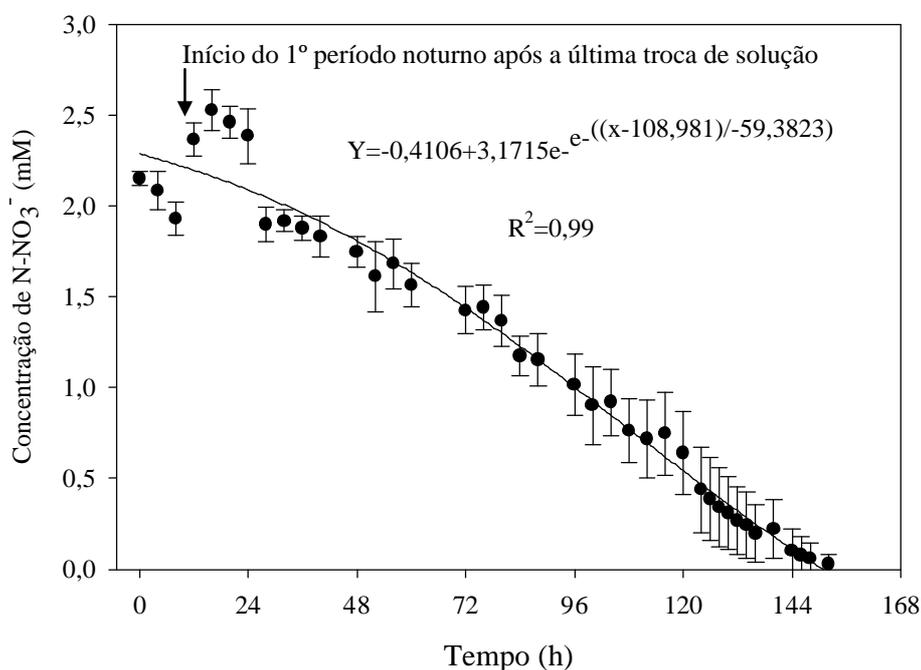


Figura 7. Depleção de nitrato na solução nutritiva por plantas de arroz (var. Caiapó).

MATT (2001) mostrou que a absorção de nitrato durante o dia, foi 40% maior que a absorção durante a noite em tabaco. Observa-se que, com a diminuição do conteúdo de nitrato na solução, a planta passa a absorver o nitrato independentemente da presença ou ausência de luz (Figura 7).

Quando o suprimento de nitrato é cortado, a atividade da nitrato redutase (ANR) nas raízes é sempre menor que no controle (Tabela 2). Esses resultados corroboram os encontrados por FERNANDES & ROSSIELO (1995) que correlacionam positivamente a atividade da nitrato redutase com o fluxo do seu substrato no citosol das células. O comportamento da ANR nas bainhas parece não seguir essa mesma lógica, ao se observar que quantidades significativas de nitrato são remobilizadas (Tabela 3) desses tecidos e isso não está relacionado com uma maior ANR (Tabela 2). O que parece acontecer, é que o nitrato remobilizado das bainhas (Tabela 3), é em sua maioria reduzido nas folhas, já que nas primeiras 24h após a retirada do NO₃⁻ da solução não se observa diferença entre a ANR das folhas nas plantas com e sem nitrato em solução.

Tabela 2. Atividade da Nitrato Redutase ($\mu\text{moles de NO}_2^- \text{ g}^{-1} \text{ de MF h}^{-1}$) em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz cultivadas com 2 mmoles L^{-1} de NO_3^- na solução nutritiva ou sob depleção do NO_3^- durante 72 h.

Coletas (horas)	NO_3^- na solução nutritiva (mmoles L^{-1})							
	0		2,0		0		2,0	
	FOLHA		RAIZ		BAINHA			
0 h	0,52 Aa*	0,48 Ba	0,49 Ab	1,62 Ba	0,17 Ba	0,06 Ab		
24 h	0,67 Aa	0,59 Ba	0,56 Ab	1,68 Ba	0,15 Ba	0,07 Ab		
48 h	0,23 Bb	0,60 Ba	0,30 Bb	1,69 Ba	0,22 Aa	0,10 Ab		
72 h	0,28 Bb	0,97 Aa	0,26 Bb	2,14 Aa	0,15 Ba	0,11 Aa		
CV (%)	31,90		22,33		25,29			

* Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas para cada parte da planta não diferem entre si pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de significância.

De maneira oposta ao observado nas raízes, a ANR nas bainhas foi sempre maior após o esgotamento do nitrato na solução nutritiva, valendo ressaltar que são atividades muito baixas quando comparado com as outras partes da planta (Tabela 2).

Quando as plantas foram cultivadas permanentemente com 2 mmoles L^{-1} de nitrato, os maiores níveis desse nutriente são observados nas bainhas, demonstrando ser este o compartimento preferencial das plantas de arroz para o armazenamento do nitrato (Tabela 3). Se admitirmos que as bainhas são os locais preferenciais de armazenagem de nitrato (Tabela 3), poderíamos também supor que há um maior fluxo de nitrato para esse tecido. Entretanto, a ANR não é proporcional a esse fluxo. Isso também nos permite especular que pode haver uma menor expressão dessa enzima NR neste tecido ou mesmo que o volume ocupado pelo citosol seja extremamente reduzido.

Tanto nas raízes como nas folhas, a atividade de remobilização do nitrato se dá de maneira mais rápida nas primeiras 24 horas (Tabela 3), justificando a maior atividade da NR nesse período (Tabela 2).

Após o esgotamento do conteúdo de nitrato na solução nutritiva, o teor deste nutriente presente em todas as partes da planta sofre diminuição gradativa, o que é mais evidente na raiz e bainha, mostrando que esses dois locais são preferenciais em relação à remobilização desse ânion (Tabela 3).

A planta quando sob deficiência de nitrato na solução do solo inicia o processo de remobilização desse nutriente para que possam ser mantidas todas as reações e processos metabólicos necessários para a sua sobrevivência. A saída deste nutriente do pool de reserva (vacúolo) da planta se dá através de um simporte com um próton NO_3^-/H^+ , sendo portanto necessária a criação de um gradiente de prótons de dentro para fora do vacúolo para que este nutriente possa ser remobilizado. A criação deste gradiente de prótons se dá à custa de energia metabólica (ATP e PPi) através da ação de duas bombas de prótons presentes na membrana vacuolar (H^+ -ATPase e H^+ -PPase). Talvez, devido ao fato dessas enzimas serem fortes drenos de energia e o experimento ter sido conduzido sob baixa luminosidade (aprox. 80 $\mu\text{moles de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), não tenha havido aumentos significativos nos teores de açúcares solúveis depois da retirada do N-NO_3^- da solução quando comparado com o tratamento que permaneceu com 2 mmoles.L^{-1} deste nutriente (Tabela 3).

Houve um aumento significativo nos teores de N-amino livre, entre as coletas de 0 a 72 horas, tanto nas folhas quanto nas raízes das plantas submetidas à nutrição constante com 2 mmoles L^{-1} de NO_3^- (Tabela 3). A elevada concentração de nitrato na solução nutritiva a que as plantas estavam submetidas aumentou o conteúdo desse

nutriente no interior da planta, que, através da ação das enzimas de assimilação de N elevou os teores de N-Amino livre.

Não há decréscimo nos teores de N-amino quando as plantas estão sob condições de privação de fonte externa de N. Por outro lado, observa-se que mesmo com a falta desse nutriente, os níveis de N-amino não sofrem grandes reduções, indicando que as plantas devem estar remobilizando o NO_3^- acumulado nos vacúolos a fim de manter uma homeostase metabólica.

Tabela 3. Teores de N-NO_3^- ($\mu\text{moles de NO}_3^- \text{ g}^{-1}$ de massa fresca), N-Amino ($\mu\text{moles de N-Amino g}^{-1}$ de massa fresca), N-NH_4^+ ($\mu\text{moles de NH}_4^+ \text{ g}^{-1}$ de massa fresca) e Açúcares solúveis ($\mu\text{moles de açúcares solúveis g}^{-1}$ de massa fresca) em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz cultivadas com 2 mmoles L^{-1} de NO_3^- na solução nutritiva ou sob depleção do NO_3^- durante 72 h.

N-NO_3^-						
Coletas (horas)	NO_3^- na solução nutritiva (mmoles L^{-1})					
	0		2,0		0	
	FOLHA		RAIZ		BAINHA	
0 h	8,78 Ab*	23,73 Aa	15,54 Ab	21,50 Ba	24,13 Ab	31,78 Ba
24 h	7,36 Ab	20,14 Aa	9,93 Ab	23,93 Ba	16,22 Bb	30,63 Ba
48 h	3,10 Bb	14,19 Ba	1,68 Bb	22,17 Ba	9,39 Cb	35,97 Ba
72 h	2,69 Bb	13,24 Ba	0,23 Bb	29,61 Aa	3,77 Cb	44,97 Aa
CV (%)	31,47		24,98		16,57	
N-Amino						
0 h	6,90 Ab*	8,80 Ba	4,89 Aa	5,48 Ba	6,95 Aa	8,33 Aa
24 h	6,44 Ab	9,19 Ba	6,87 Ab	10,10 Aa	5,71 Ab	9,14 Aa
48 h	6,04 Ab	10,70 Aa	7,46 Aa	9,54 Aa	5,44 Ab	7,51 Aa
72 h	5,07 Ab	12,36 Aa	6,91 Ab	11,36 Aa	6,36 Aa	7,92 Aa
CV (%)	14,73		20,90		18,20	
N-NH_4^+						
0 h	0,84 Ab*	1,05 Ba	0,58 Aa	0,48 Bb	0,60 Ba	0,64 Aa
24 h	0,79 Ab	0,97 Ba	0,48 Bb	0,61 Aa	0,51 Bb	0,76 Aa
48 h	0,77 Ab	1,12 Aa	0,45 Ba	0,50 Ba	0,55 Bb	0,66 Aa
72 h	0,73 Ab	1,21 Aa	0,43 Bb	0,60 Aa	0,71 Aa	0,72 Aa
Média	0,78 b	1,09 a	0,48 b	0,55 a	0,59 b	0,70 a
CV (%)	7,68		11,74		11,14	
Açúcares solúveis						
0 h	62,9 Ba*	52,59 Ba	10,66 Aa	9,09 Aa	27,70 Ba	25,39 Aa
24 h	73,65 Ba	56,31 Ba	14,05 Aa	10,81 Aa	24,94 Ba	24,24 Aa
48 h	89,73 Aa	74,16 Aa	15,45 Aa	10,15 Ab	31,04 Ba	26,09 Aa
72 h	102,3 Aa	84,51 Aa	15,88 Aa	14,49 Aa	53,18 Aa	30,75 Ab
Média	82,16 a	66,89 b	14,00 a	11,14 a	34,22 a	26,62 b
CV (%)	16,76		25,85		23,08	

* Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de significância.

Nas bainhas, de maneira distinta do que ocorre nas folhas e raízes, não se observam aumentos nos teores de N-amino quando as plantas são nutridas constantemente com 2 mmoles L^{-1} de NO_3^- . Esta constatação pode ser um indicativo de que neste tecido a área citosólica é muito pequena, prejudicando dessa forma o contato da NR com o seu substrato. A presença de área citosólica pequena e vacúolos grandes

nas células das bainhas realçariam ainda mais a sua função como tecido preferencial ou especializado para acúmulo de NO_3^- .

O conteúdo de N-Amino nas folhas e bainhas entre os tratamentos é sempre igual ou menor onde houve esgotamento do suprimento de NO_3^- , indicando uma menor velocidade de redução do N, que como pode ser observado na Tabela 3 está sendo remobilizado. Isto mostra que as plantas de arroz da Var. Caiapó, quando se encontram sob deficiência de N, remobilizam o N presente no vacúolo numa velocidade mais baixa do que pode absorvê-lo, podendo ser esta uma estratégia para garantir um maior período de sobrevivência ou mesmo uma característica da variedade que procura poupar o N armazenado quando sob deficiência deste nutriente em solução.

Há uma queda significativa no conteúdo de N-NH_4^+ das raízes das plantas nas primeiras 24 horas após o esgotamento do N-NO_3^- da solução nutritiva (Tabela 3). Tanto para folhas quanto para raízes, os teores de amônio nas plantas submetidas ao esgotamento de NO_3^- em solução, relacionam-se negativamente com os teores de açúcares solúveis ($R=-0,97$ e $R=-0,99$, respectivamente para folhas e raízes).

De maneira distinta do que ocorre nas raízes e bainhas das plantas que foram supridas permanentemente com 2 mmol L^{-1} de N-NO_3^- em solução, nas folhas há aumento no conteúdo de N-NH_4^+ entre as coletas feitas a 0 e 72 horas. Se observarmos os valores médios de cada tratamento, podemos constatar que os menores teores de N-NH_4^+ ocorreram em todas as partes das plantas cultivadas com depleção do N da solução nutritiva (Tabela 3).

Houve aumento nos teores de açúcares solúveis nas folhas e bainhas das plantas após o esgotamento do conteúdo de NO_3^- na solução nutritiva (Tabela 3). Isto se dá provavelmente porque há uma diminuição gradativa no conteúdo de NO_3^- presente no pool de reserva da planta com o decorrer do tempo. Nas folhas, a remobilização do NO_3^- presente nos vacúolos é suficiente para garantir um teor de açúcares solúveis sem diferenças significativas apenas nas primeiras 24 h. Nas bainhas, o aumento no conteúdo de açúcares solúveis só pode ser observado a partir de 48 h após esgotamento do conteúdo de N-NO_3^- na solução.

Apesar do conteúdo de açúcares solúveis ser sempre levemente maior no tratamento onde houve esgotamento do conteúdo externo de nitrato, não se observa diferenças significativas entre os dois tratamentos no decorrer do tempo. Por outro lado, quando se observa à média entre os dois tratamentos, constata-se que nas folhas e bainhas, o conteúdo de açúcares solúveis é significativamente maior no tratamento onde houve esgotamento do N da solução (Tabela 3).

Foi observada uma relação negativa ($R=-0,97$) entre os teores de N-amino livre e açúcares solúveis nas folhas das plantas após esgotamento do conteúdo de N-NO_3^- na solução, indicando que a diminuição no conteúdo de N-amino com conseqüente aumento no teor de açúcares solúveis é devido ao decréscimo no conteúdo de NO_3^- no interior deste tecido no decorrer do tempo, e pode também estar relacionado a uma menor remobilização do NO_3^- estocado. Nas raízes, para o mesmo tratamento a relação entre N-amino e açúcares solúveis é alta ($R=0,94$) e positiva, indicando que a remobilização ocorre de maneira mais rápida mantendo o conteúdo de N-amino aproximadamente constante até as 72 h após esgotamento do NO_3^- em solução. Talvez esta manutenção do conteúdo de N-amino (Tabela 3) nas raízes ocorra em função da necessidade de aminoácidos para suportar o crescimento radicular observado neste órgão após esgotamento do suprimento de N externo (Tabela 4).

O conteúdo de N-total das folhas não varia dentro dos dois tratamentos, no entanto, pode-se notar que após o esgotamento do NO_3^- na solução, o conteúdo de N-total é sempre mais baixo (Tabela 4).

Na raiz, de maneira similar às folhas, não há diferença do conteúdo de N-total no decorrer do tempo, dentro de cada um dos tratamentos com e sem a presença de nitrato em solução. Por outro lado, de maneira diferente da observada nas folhas, o conteúdo de N nas raízes não varia entre os dois tratamentos. Esta observação pode indicar que sob condição de privação de N os tecidos das raízes são mais favorecidos com compostos nitrogenados para garantir o crescimento radicular observado sob privação de N-NO_3^- (Tabela 4).

Tabela 4. N-total (mg de N g^{-1} de massa seca) e Massa fresca (g) observada em folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz cultivadas com 2 mmoles L^{-1} de NO_3^- na solução nutritiva ou sob depleção do NO_3^- durante 72 h.

Coletas (horas)	N-total							
	NO_3^- na solução nutritiva (mmoles L^{-1})							
	0		2,0		0		2,0	
	FOLHA		RAIZ		BAINHA			
0 h	37,4Ab*	44,41 Aa	20,33 Aa	23,03 Aa	28,23 Aa	29,16 Aa		
24 h	40,30 Aa	45,93 Aa	18,17 Aa	22,07 Aa	22,98 Bb	26,61 Ba		
48 h	34,70 Ab	51,37 Aa	21,18 Aa	24,28 Aa	20,03 Cb	25,47 Ba		
72 h	34,41 Ab	49,52 Aa	16,41 Aa	19,85 Aa	14,93 Db	26,16 Ba		
CV (%)	10,07		15,31		6,26			
	Massa Fresca							
0 h	5,56 Ba	5,47 Aa	5,77 Ba	5,58 Aa	7,59 Ba	7,61 Aa		
24 h	5,63 Ba	5,31 Aa	5,77 Ba	4,89 Aa	7,56 Ba	7,85 Aa		
48 h	6,06 Ba	5,82 Aa	6,65 Ba	5,30 Ab	8,16 Ba	8,26 Aa		
72 h	6,96 Aa	5,91 Ab	8,60 Aa	4,84 Ab	9,38 Aa	7,87 Ab		
CV (%)	10,36		10,47		8,99			

* Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo teste Scott Knott ao nível de 5% de significância.

Na bainha, ocorre um decréscimo contínuo e significativo do conteúdo de N no tratamento onde é cortado o suprimento externo de nitrato (Tabela 4). Isto se deve à contínua remobilização de N deste tecido, que se mostra como principal local de reserva deste nutriente (Tabela 3). Quando a planta é mantida sob nutrição constante com 2 mmoles L^{-1} de N-NO_3^- o conteúdo de N-total deste tecido não sofre grandes variações.

Sob condição de privação de N, há um estímulo ao crescimento radicular que se torna mais evidente a partir das 48 h horas após esgotamento do suprimento externo de N-NO_3^- (Tabela 4). Segundo LÓPEZ-BUCIO et al. (2003) mudanças na arquitetura radicular podem mediar a adaptação de plantas a solos em que a disponibilidade de nutrientes é limitada pelo aumento da superfície de absorção do sistema radicular. Há também evidências de que o aumento do conteúdo interno de açúcares transportado no floema tenha efeito estimulatório do desenvolvimento do sistema radicular (FORDE, 2002b).

Nas folhas e bainha, também foi verificado um aumento na massa fresca das plantas que teve o suprimento externo de N-NO_3^- esgotado. No entanto, esta constatação só pode ser observada a partir de 72 h após esgotamento do conteúdo de NO_3^- na solução nutritiva (Tabela 4).

No decorrer do tempo, dentro de cada tratamento, nota-se que quando as plantas são submetidas a um suprimento constante de 2 mmoles L^{-1} de NO_3^- não há aumento significativo na massa fresca em todas as partes da planta. Por outro lado, quando o

suprimento externo de NO_3^- foi esgotado houve aumento na massa fresca a partir da 72 horas em todas as partes da planta.

Esses resultados mostram que nessa fase de crescimento a bainha das folhas de arroz é o sítio preferencial de acúmulo de nitrato, enquanto que nos outros tecidos (raiz e folha) a atividade de assimilação ocorre em maior intensidade. Sob condição normal de N na solução nutritiva a atividade da nitrato redutase é muito baixa nas bainhas, caracterizando esse tecido como especializado em armazenar o NO_3^- em excesso. Somente após a depleção de N da solução nutritiva a planta começa a remobilizar o NO_3^- armazenado nas bainhas, suprindo para suprir as necessidades de nitrogênio do vegetal.

4.2 Dinâmica de Absorção de NO_3^- entre as Variedades Piauí e IAC-47

A variedade IAC-47 mostrou-se mais desenvolvida que a Piauí, com maiores valores de massa fresca em todas as partes da planta (Tabela 5). Isso se deve pelo menos em parte a um estresse sofrido pelas plantas da variedade Piauí após a transferência para câmara de crescimento que havia sido submetida a um expurgo com formaldeído poucos dias antes de receber as plantas.

Para as duas variedades estudadas não houve diferença entre os valores de massa fresca em todas as partes da plantas nas duas concentrações de nitrato (Tabela 5), provavelmente devido ao curto período de tempo de acompanhamento do ensaio após adição dos tratamentos (48h).

Tabela 5. Massa fresca (g/vaso) de raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas concentrações de N-NO_3^- (0,2 e 2 mmoles.L^{-1}).

Tempo (h)	0,2 mmoles.L^{-1} de NO_3^-					
	Raiz		Bainha		Folha	
	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47
0	3,93 ± 0,73*	7,59 ± 1,30	7,92 ± 1,74	15,81 ± 2,85	6,03 ± 1,26	11,27 ± 1,93
6	4,18 ± 0,37	7,90 ± 2,31	7,55 ± 0,60	15,80 ± 3,70	5,73 ± 0,23	11,05 ± 2,67
24	4,68 ± 0,33	9,43 ± 2,49	8,49 ± 0,76	17,67 ± 2,17	6,27 ± 0,53	12,76 ± 1,77
48	4,48 ± 1,18	8,53 ± 0,90	7,79 ± 1,39	15,53 ± 1,08	6,13 ± 1,22	11,43 ± 0,93
Tempo (h)	2 mmoles.L^{-1} de NO_3^-					
	Raiz		Bainha		Folha	
	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47
0	3,93 ± 0,73	7,59 ± 1,30	7,92 ± 1,74	15,81 ± 2,85	6,03 ± 1,26	11,27 ± 1,93
6	4,29 ± 0,64	8,15 ± 0,41	8,85 ± 0,62	15,42 ± 0,81	6,76 ± 0,50	10,74 ± 0,50
24	3,25 ± 1,20	10,69 ± 2,04	7,73 ± 3,12	17,78 ± 3,14	5,97 ± 1,94	12,72 ± 2,26
48	4,07 ± 0,32	8,48 ± 2,77	8,34 ± 0,38	17,66 ± 6,66	6,29 ± 0,42	12,26 ± 4,38

*Os valores são médias de quatro repetições ± o desvio padrão da média.

Mesmo apresentando um desenvolvimento do sistema radicular inferior ao da variedade IAC-47, a variedade Piauí quando submetida à dose de 0,2 mmoles.L^{-1} de N-NO_3^- consome o nitrato mais rapidamente (Figura 8A). Aparentemente, as duas variedades atingem o Cmin (concentração do nutriente em solução nutritiva no qual o influxo líquido é zero) em concentrações diferentes de NO_3^- , o que também foi observado para NH_4^+ por BAPTISTA et al. (2000). Às 20 horas o conteúdo de nitrato fornecido à variedade Piauí na dose de 0,2 mmoles.L^{-1} , chega a zero, enquanto a variedade IAC-47 parece não conseguir esgotar totalmente o conteúdo de NO_3^- da solução nutritiva. Esta observação sugere que o sistema de alta afinidade para absorção

de nitrato da variedade Piauí é mais eficiente que o da variedade IAC-47. Poderia ser esta maior eficiência talvez, uma isoforma mais competente de transportador de alta afinidade para absorção de nitrato presente na variedade Piauí.

Em virtude do menor desenvolvimento do sistema radicular das plantas da variedade Piauí, esta apresenta um menor influxo de NO_3^- na dose de $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. No entanto, não se observa diferenças no pH da solução nutritiva entre estas duas variedades nessa mesma dose (Figura 9 B).

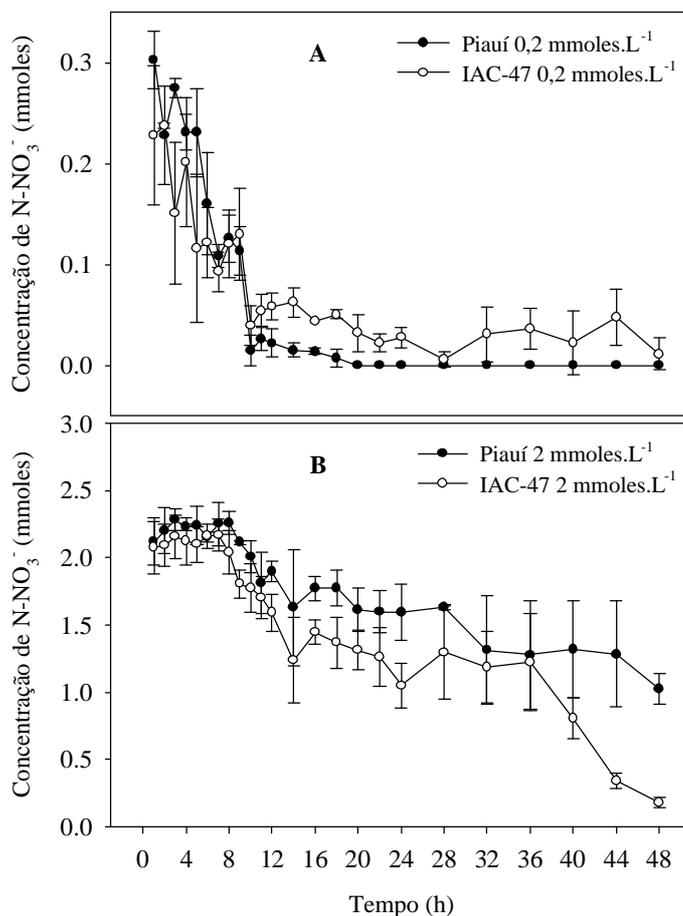


Figura 8. Depleção de N-NO_3^- na solução nutritiva com o cultivo de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (A) e $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de N-NO_3^- (B), depois de 72 horas de privação deste nutriente.

As plantas da variedade IAC-47 promoveram maior acidificação da solução nutritiva na concentração de $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de N-NO_3^- que a variedade Piauí (Figura 9). A absorção do NO_3^- ocorre em simporte com dois H^+ e talvez por isso o pH da solução fornecida a variedade Piauí ficou mais alcalino, já que esta variedade absorveu mais nitrato que a var. IAC-47. Além disso, o sistema radicular da variedade IAC-47 estava bem mais desenvolvido que a da var. Piauí (Tabela 5) e parte desta acidificação observada pode ser devido a isto.

Se observarmos que as $\text{P-H}^+\text{-ATPases}$ funcionam no processo de absorção de nitrato para geração ou manutenção do gradiente de prótons, podemos chegar a conclusão a partir da observação da Figura 9B, onde as plantas estão submetidas a alta concentração de NO_3^- , que o influxo de prótons é maior que a extrusão nos estágios iniciais de absorção desse nutriente e por isso o pH da solução se torna mais alcalino.

No entanto, após o consumo ou redução substancial na quantidade de NO_3^- presente na solução nutritiva, o pH da solução volta a cair e tende a ficar constante. Neste momento, aparentemente o influxo se iguala ao efluxo de prótons. Esse fenômeno pode ser melhor visualizado nas Figura 9 C e D, onde são mostradas médias de pH e concentração de H^+ em intervalos de tempo. Nota-se principalmente na dose de 2mmoles L^{-1} de N-NO_3^- (Figura 9D), que a concentração de H^+ na solução nutritiva cai no intervalo de 11-24h e volta a subir a partir de então.

Na dose de $0,2\text{mmoles.L}^{-1}$ de NO_3^- (Figura 9A), nota-se que após a adição do nitrato o efluxo de H^+ é maior que o influxo nas primeiras 4h, e portanto, observa-se uma leve queda do pH. Vale ressaltar, que os transportadores de alta afinidade presentes no início devem ser apenas os constitutivos e em pequena quantidade, no entanto, após adição do NO_3^- ocorre à sinalização para a expressão dos transportadores induzidos (iHATS), o que aumenta o influxo de H^+ levando a um aumento do pH da solução. Da mesma forma que para altas concentrações, na dose de $0,2\text{mmoles.L}^{-1}$ quando o conteúdo de nitrato é muito reduzido, há um aumento do efluxo de prótons em relação ao influxo, diminuindo o pH da solução externa.

Se compararmos os gráficos da Figura 9 A e B, podemos notar que quando as plantas são cultivadas em 2mmoles.L^{-1} de nitrato (Figura 9B), o pH externo tende a permanecer mais elevando, mostrando que o influxo de prótons é proporcional a quantidade de NO_3^- presente na solução nutritiva. Vale notar, no entanto, que parte dos H^+ que entram junto com o nitrato são consumidos no processo de redução deste nutriente, o que pode explicar ao menos em parte a alcalinização da solução nutritiva na maior dose de nitrato.

Observa-se uma leve redução na atividade das P-H^+ -ATPases após a adição do N-NO_3^- , nas raízes da variedade Piauú nas duas doses de NO_3^- e também na variedade IAC-47 na dose de 2mmoles.L^{-1} de NO_3^- (Figura 10). No início do ensaio ensaio as plantas se encontravam há 72 horas sem NO_3^- na solução nutritiva. Como será mostrado no experimento de remobilização, a retirada brusca do N-NO_3^- da solução nutritiva funcionou como sinal para aumento o aumento da atividade das P-H^+ -ATPases e do crescimento do sistema radicular das plantas (Figura 22A).

Quando as plantas da variedade Piauú foram crescidas com $0,2\text{mmoles.L}^{-1}$ de N-NO_3^- observa-se um aumento da atividade das P-H^+ -ATPases a partir das 6 horas, chegando às 48 horas com atividade superior às da variedade IAC-47 (Figura 10 A). Esta observação pode explicar o fato da variedade Piauú ter esgotado totalmente o conteúdo de NO_3^- da solução nutritiva a partir das 20 horas (Figura 8) enquanto que a variedade IAC-47 mesmo com o sistema radicular mais desenvolvido (Tabela 5) não o tenha esgotado.

SANTI et al. (1995) em estudo utilizando plântulas de milho, mostram um aumento da atividade das P-H^+ -ATPases após adição do N-NO_3^- . Neste caso, vale ressaltar, que estes autores usaram plântulas de milho com apenas três dias após germinação, crescidas em solução contendo somente sulfato de cálcio na ausência de luz. Sob estas condições as plantas poderiam mostrar modificações no metabolismo após o primeiro contato com o NO_3^- , ativando entre outras coisas, o crescimento radicular. Outro fato a ser considerado neste caso é a ausência de luz, que diminui bastante o processo de redução do NO_3^- absorvido e conseqüentemente o consumo de prótons absorvidos juntos com este íon. Nessas condições, as bombas de prótons da plasmalema podem ser acionadas para controlar o pH do citosol retirando os prótons acumulados.

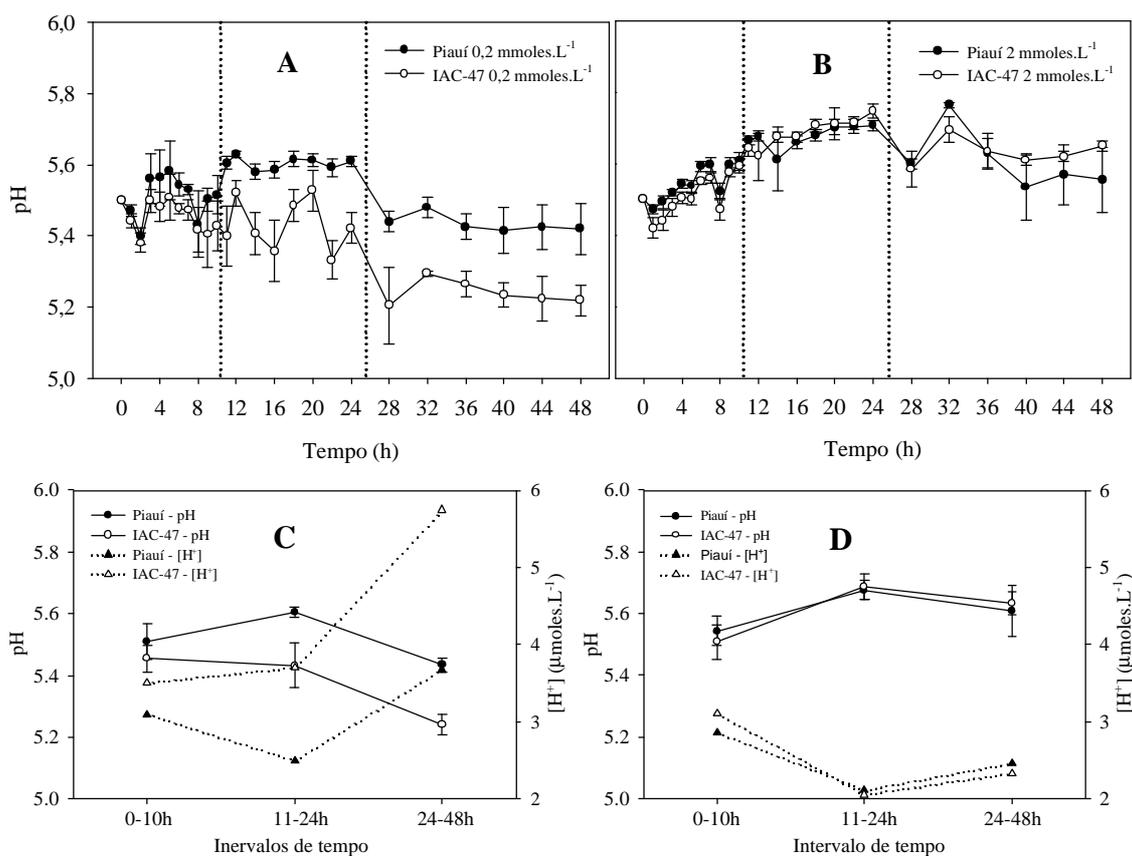


Figura 9. Variação de pH em solução nutritiva causada por duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) sob duas concentrações de N-NO_3^- ($0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ - A e 2 mmol.L^{-1} - B), depois de 72 horas de privação deste nutriente. As figuras C e D se referem a médias de pH e concentração de prótons em intervalos de tempo definidos pelas linhas pontilhadas verticais na figura acima nas concentrações de $0,2$ (C) e 2 mmol.L^{-1} de NO_3^- (D).

A nossa sugestão é de que, a atividade das P-H^+ -ATPases aumenta em função da acidificação do citosol que ocorre com a absorção do N-NO_3^- ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$), não sendo a absorção do NO_3^- uma consequência da ativação das bombas de prótons, desde que um gradiente de prótons já exista naturalmente entre o apoplasto e o citosol das células para o início da absorção do nitrato.

Dessa forma, parece haver um caráter transitório na resposta das P-H^+ -ATPases à adição do N-NO_3^- , ou seja, após a adição do nitrato a planta começa a absorvê-lo ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$) e há uma acidificação do citosol. Essa acidificação logo é controlada pela extrusão de uma grande quantidade de prótons através da ação das P-H^+ -ATPases, levando a uma diminuição do pH da solução nutritiva. Com o decorrer do tempo a planta então mantém um equilíbrio entre a absorção do nitrato e a extrusão do excedente de prótons do citosol.

Quanto à atividade das P-H^+ -ATPases nas bainhas, foi observada apenas uma leve redução na variedade IAC-47 entre as 0h e 6 h (Figura 10 C e D). As P-H^+ -ATPases na parte aérea participam dos processos de carregamento e descarregamento do xilema e floema, desenvolvimento embrionário, abertura e fechamento estomático, entre outras (SONDEGAARD et al., 2004).

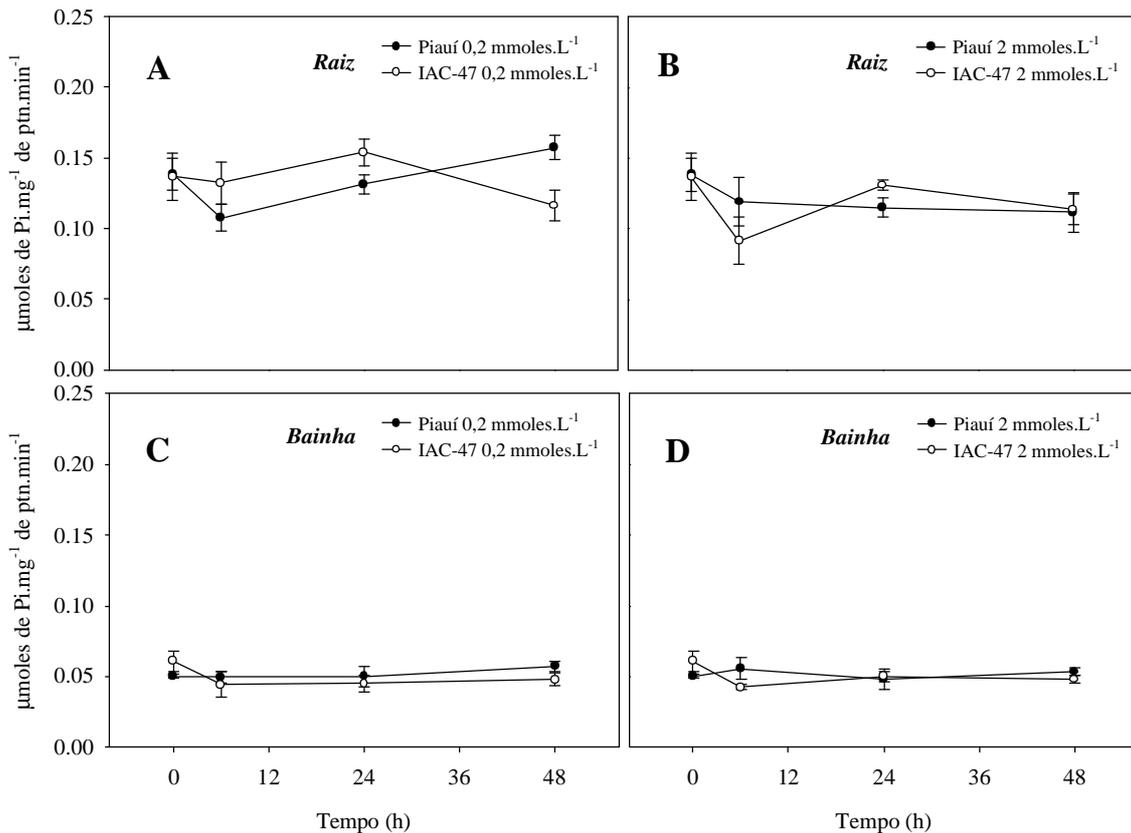


Figura 10. Atividade das P-H⁺-ATPases nas raízes e bainhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), submetidas a 0,2 mmol.L⁻¹ (A e C) e 2 mmol.L⁻¹ de NO₃⁻ (B e D) depois de 72h de privação de deste nutriente.

Segundo SONDEGAARD et al. (2004), o envio de nutrientes para a parte aérea, entre eles o NO₃⁻, é um processo dependente de energia metabólica sob a forma de ATP, consumida pelas H⁺-ATPases (Figura 14). Dessa forma, o fato das plantas terem sido cultivadas sob baixa radiação luminosa pode em parte explicar a baixa atividade das P-H⁺-ATPases nas bainhas quando comparadas as raízes.

Observa-se nos dados da Figura 11 que após a adição da solução contendo nitrato houve um aumento na atividade das V-H⁺-ATPases entre as 0 e 6 horas. Neste mesmo intervalo de tempo pode ser observado um aumento nos teores internos de nitrato nas raízes e folhas (Figura 15). Dessa forma, o aumento na atividade das V-ATPases pode ser uma estratégia usada pela planta para o controle de cargas no interior do vacúolo que tende a ficar muito eletrogênico com a entrada de grandes quantidades de nitrato, que ocorre através de um canal.

A maneira pela qual o controle de cargas no interior do vacúolo é mediado pelas V-H⁺-ATPases se dá através do bombardeamento de H⁺ para dentro desse compartimento que energiza antiportes com Na⁺/H⁺ e Ca⁺²/2H⁺. A absorção vacuolar de sódio é mediada por um antiporte Na⁺/H⁺ (transporte ativo secundário) no tonoplasto e esta energia próton motriz é fornecida pela atividade da V-ATPases (RATAJCZAK, 2000). Dessa forma o aumento da atividade das V-H⁺-ATPases concomitantemente ao aumento nos teores de NO₃⁻ nos tecidos ocorre pela necessidade do restabelecimento do equilíbrio de cargas no interior do vacúolo alterada devido ao acúmulo excessivo de NO₃⁻.

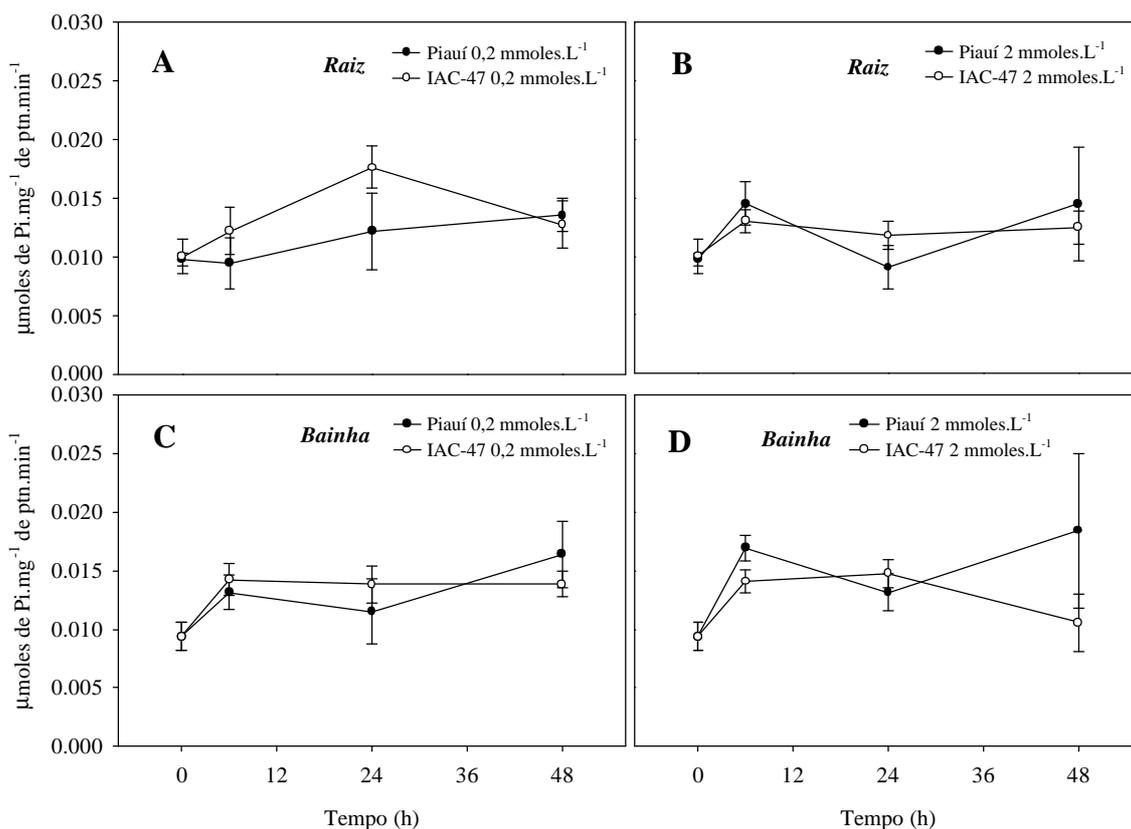


Figura 11. Atividade das V-H⁺-ATPases nas raízes e bainhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), submetidas a duas concentrações de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmol.L⁻¹) depois de 72h de privação de deste nutriente.

Nota-se na Figura 12 A e B, que a atividade das H⁺-PPases foi sempre maior nas raízes da variedade IAC-47 quando comparada a variedade Piauí. As H⁺-PPases são geralmente tidas por diversos pesquisadores como uma bomba de H⁺ auxiliar as V-H⁺-ATPases quando o suprimento energético está baixo. Se observarmos a Figura 18, veremos que os teores de açúcares solúveis (energia prontamente disponível) da variedade IAC-47 estão mais baixos que o da variedade Piauí, principalmente nas plantas sob 0,2 mmol.L⁻¹ de NO₃⁻. Dessa forma, é possível que as plantas da var. IAC-47 tenham usado mais intensamente as H⁺-PPases devido ao baixo conteúdo energético no qual se encontravam.

As maiores atividades da nitrato redutase para variedade Piauí são observadas nas raízes nas duas doses de N-NO₃⁻ (Figura 13 A e B).

Na maioria das plantas, quando as raízes recebem pequenas quantidades de nitrato, o mesmo é reduzido principalmente nesse órgão (TAIZ & ZEIGER, 2004). Isso é o que acontece nas primeiras 6h com as plantas das duas variedades quando são submetidas a 0,2 mmol L⁻¹ de NO₃⁻.

O balanço da redução do NO₃⁻ entre raiz e parte aérea pode variar de espécie para espécie, onde em geral, as espécies nativas de clima temperado dependem mais intensamente da assimilação do nitrato pelas raízes, enquanto que espécies tropicais e subtropicais assimilam a maioria do nitrato na parte aérea (TAIZ & ZEIGER, 2004). Nota-se na Figura 13, que para variedade Piauí houve preferência de redução do nitrato nas raízes, enquanto que para variedade IAC-47 essa preferência só acontece nas

primeiras 6h, não havendo grandes diferenças de redução de nitrato entre raiz e parte aérea para esta variedade.

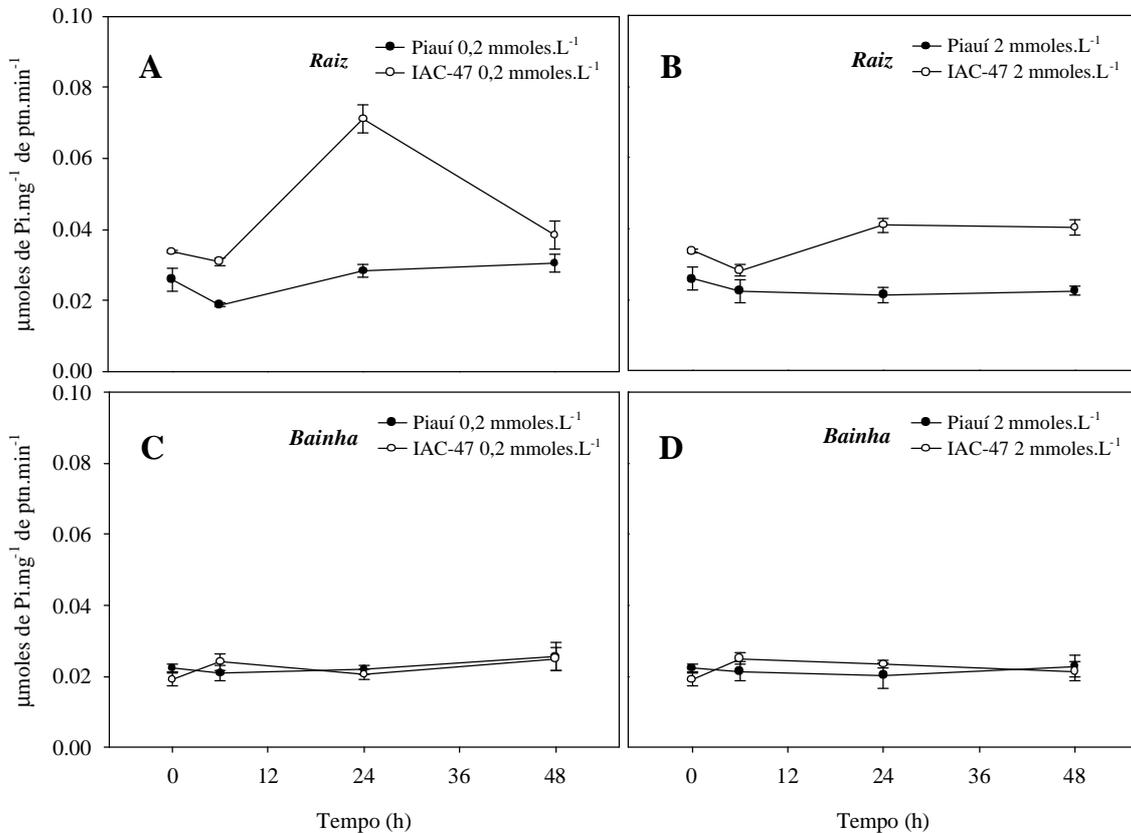


Figura 12. Atividade das H⁺-PPases nas raízes e bainhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), submetidas a duas concentrações de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmol.L⁻¹) depois de 72h de privação de deste nutriente.

Talvez pelo fato das plantas da variedade Piauí ter apresentado uma preferência de redução do nitrato nas raízes (Figura 13 A e B), houve um maior acúmulo de açúcares solúveis nas folhas desta variedade (Figura 18 E e F), já que o envio deste nutriente para parte aérea ocorre à custa de energia metabólica sob a forma de ATP através das bombas de prótons (Figura 14).

Quando as plantas de ambas as variedades são cultivadas em solução nutritiva contendo 0,2 mmol.L⁻¹ de NO₃⁻ nota-se que há um rápido aumento na atividade da nitrato redutase nas raízes entre 0h e 6 horas e uma posterior queda a partir de então. Esta observação está de acordo com os dados da curva de depleção de NO₃⁻ observados na Figura 8A, onde a queda do conteúdo de nitrato na solução nutritiva acompanha a queda na atividade da NR. Nota-se também na Figura 15A que a partir das 6 horas há uma queda no conteúdo interno de nitrato nas raízes das plantas submetidas inicialmente a 0,2 mmol.L⁻¹ de N-NO₃⁻.

Quando as plantas são cultivadas na solução contendo 2 mmol.L⁻¹ de NO₃⁻ a atividade da nitrato redutase nas raízes aumenta bastante entre 0h e 6 horas e se mantém elevada até as 48 horas. Para a variedade IAC-47 observa-se uma queda expressiva da atividade da nitrato redutase (ANR) as 24 horas, no entanto há um aumento da ANR nas folhas (Figura 13F), neste mesmo período.

Nas folhas, nota-se que nas duas doses de NO_3^- há um leve aumento da ANR a partir das 6 horas, sem grandes diferenças entre as variedades. No entanto, a ANR nas folhas da var. IAC-47 tende a ser um pouco superior quando comparada a var. Piauí na dose de 2 mmol.L^{-1} de NO_3^- (Figura 13 E e F).

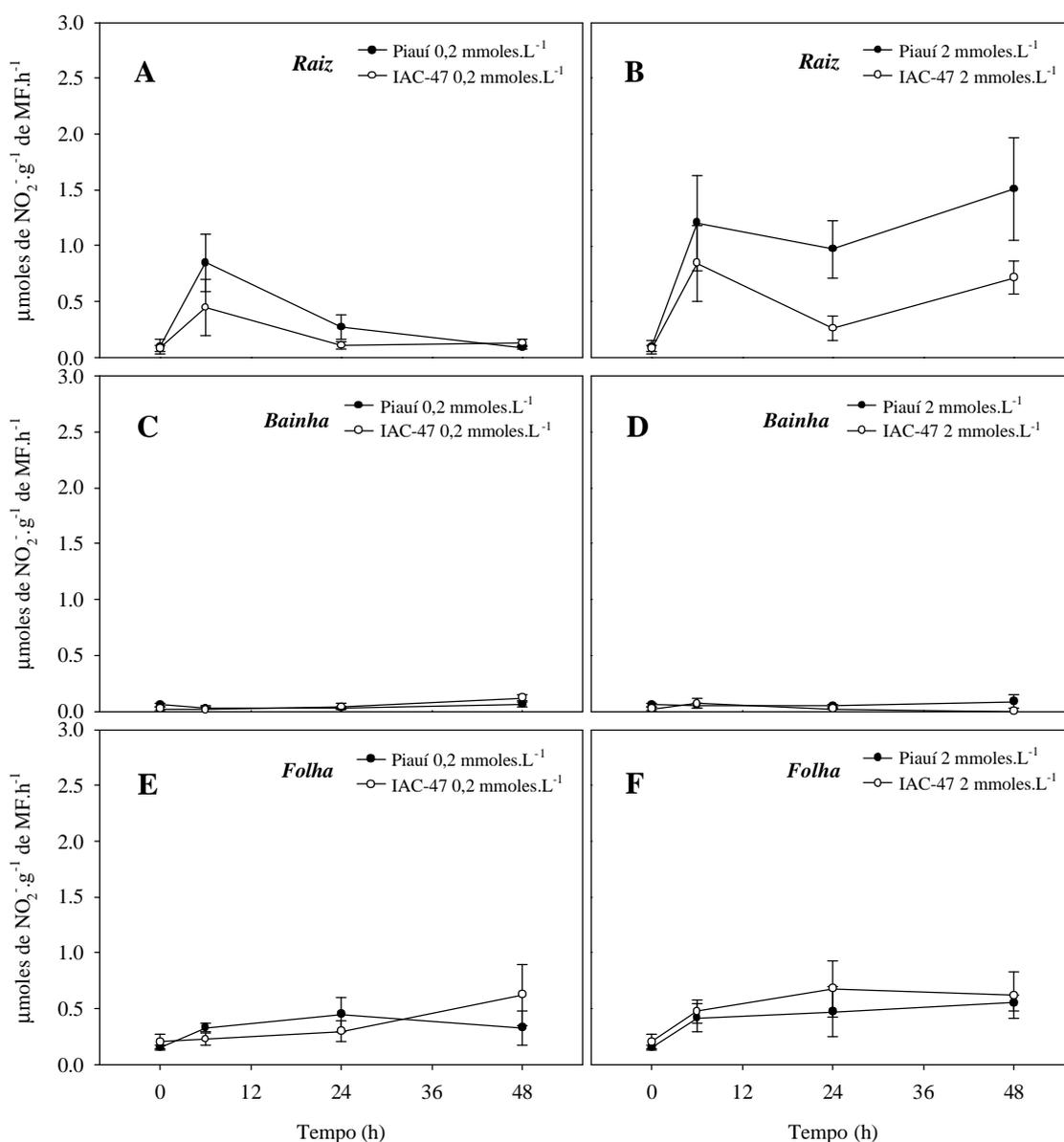


Figura 13. Atividade da nitrato redutase (NR) nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO_3^- ($0,2$ e 2 mmol.L^{-1}) depois de 72 horas de privação deste nutriente.

Conforme pode ser notado na Figura 15, nas duas concentrações de N-NO_3^- estudadas as plantas da variedade Piauí acumulam mais nitrato nas raízes que a variedade IAC-47, enquanto esta acumula mais que a Piauí nas bainhas. Embora isto ocorra, vale notar que a variedade Piauí, assim como a IAC-47 apresenta o pool de reserva de nitrato nas bainhas, ou seja, a maior quantidade de nitrato acumulada na

planta está localizada neste tecido. Isto é particularmente válido para os níveis mais elevados de NO_3^- na solução (2mmoles.L^{-1}).

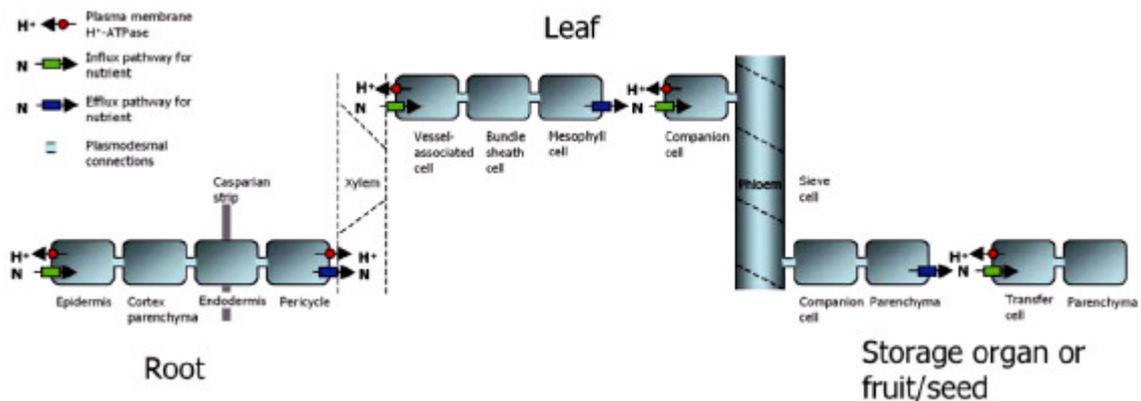


Figura 14. Visão geral das barreiras de transporte no corpo da planta e a energização da absorção celular de nutrientes pelas H^+ -ATPases da membrana plasmática. Fonte: SONDERGAARD et al. (2005).

Além de apresentar uma maior atividade da nitrato redutase nas raízes (Figura 13A e B), as plantas da variedade Piauí também mostram maiores acúmulos de nitrato neste tecido quando comparada a IAC-47 (Figura 15A e B). Este comportamento da variedade Piauí pode ser uma estratégia de economia de energia, pois além de não enviar o nitrato para redução na parte aérea da planta acumulá-lo nas raízes. Esta aparente maior eficiência energética da variedade Piauí quando submetida à baixa luminosidade pode ser meramente uma resposta adaptativa, onde a arquitetura da planta, bem como a condição ambiental em que a mesma foi desenvolvida, não proporcionam alta taxa fotossintética. A condição de dias nublado na época das chuvas e seca na outra metade do ano, associado à arquitetura das folhas desta variedade (folhas superiores sombreando as inferiores) são características que a levam ter uma menor taxa fotossintética quando comparada a var. IAC-47.

Quando as plantas de ambas as variedades foram cultivadas com $0,2\text{mmoles.L}^{-1}$ de nitrato, nota-se que a partir das 6 horas há uma contínua queda nos teores de NO_3^- em todas as partes da planta, enquanto que na dose de 2mmoles.L^{-1} de nitrato, há um aumento até às 24h e uma tendência de equilíbrio até as 48 horas.

Na dose de $0,2\text{mmoles.L}^{-1}$ de N-NO_3^- o acúmulo deste nutriente é maior na raiz para a variedade Piauí e nas folhas e bainhas para a variedade IAC-47. O fato de a variedade Piauí ter apresentado os menores valores de acúmulo de NO_3^- nas bainhas nas duas doses de N estudadas pode ser decorrente dos maiores valores de nitrato acumulado nas raízes e de uma ANR também maior neste tecido. A atividade da GS também é maior nas raízes da variedade Piauí (Figura 16).

Tanto na dose de $0,2\text{mmoles.L}^{-1}$ como na dose de 2mmoles.L^{-1} de N-NO_3^- , a atividade da GS nas raízes é maior na variedade Piauí quando comparada à variedade IAC-47 (

Figura 16). Somente às 48 horas, na dose de $0,2\text{mmoles.L}^{-1}$ não há diferença na atividade da GS nas raízes entre as duas variedades. Estes resultados estão de acordo com os observados para a ANR, também maior nas raízes da variedade Piauí nas duas doses de N.

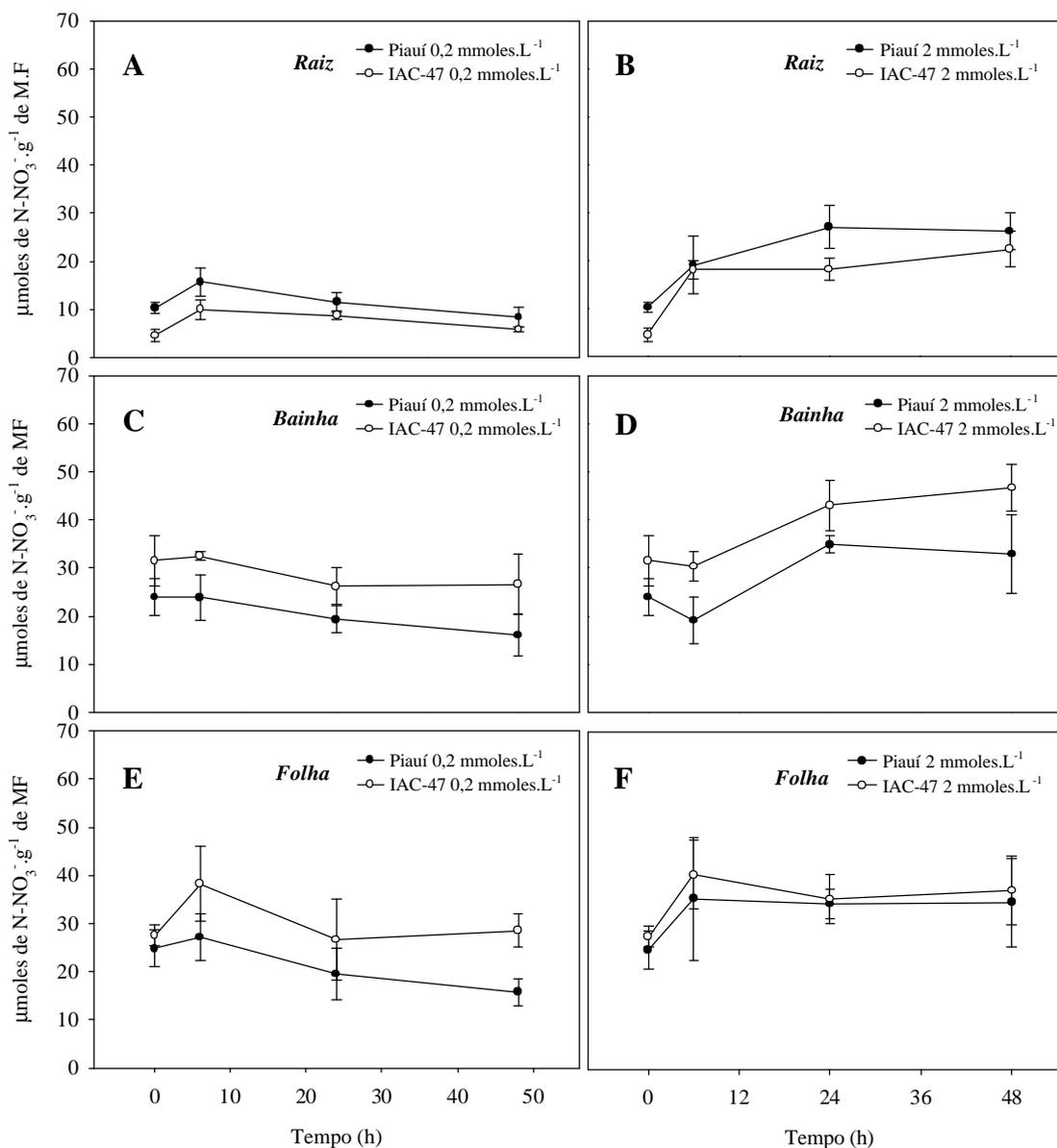


Figura 15. Teores de N-NO₃⁻ nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmol.L⁻¹) depois de 72 horas de privação deste nutriente.

Os baixíssimos valores da ANR nas bainhas de ambas variedades nas duas doses de N também se refletem em baixas e não significativas atividades da GS neste tecido. Por outro lado, ao contrário do observado para nitrato redutase que possui as maiores atividades nas raízes, a atividade da GS é claramente maior nas folhas. A GS utiliza o ATP para catalizar a reação entre o 2-oxoglutarato e NH₄⁺ e formar a glutamina, portanto, é de se esperar que esta enzima possua maior atividade nas folhas, já que o ATP é mais produzido neste tecido através das reações da fotossíntese.

Entre as variedades, a atividade da GS nas raízes é maior para a Piauí. No entanto, nas bainhas e folhas não há um padrão de resposta a favor de uma ou outra variedade (

Figura 16). Nota-se que a 2 mmoles.L⁻¹ de NO₃⁻ a variedade Piauí não mostra grandes variações na atividade da GS nas folhas no correr do tempo (

Figura 16F), enquanto que na variedade IAC-47 pode-se observar um aumento até as 24 horas com posterior queda às 48h.

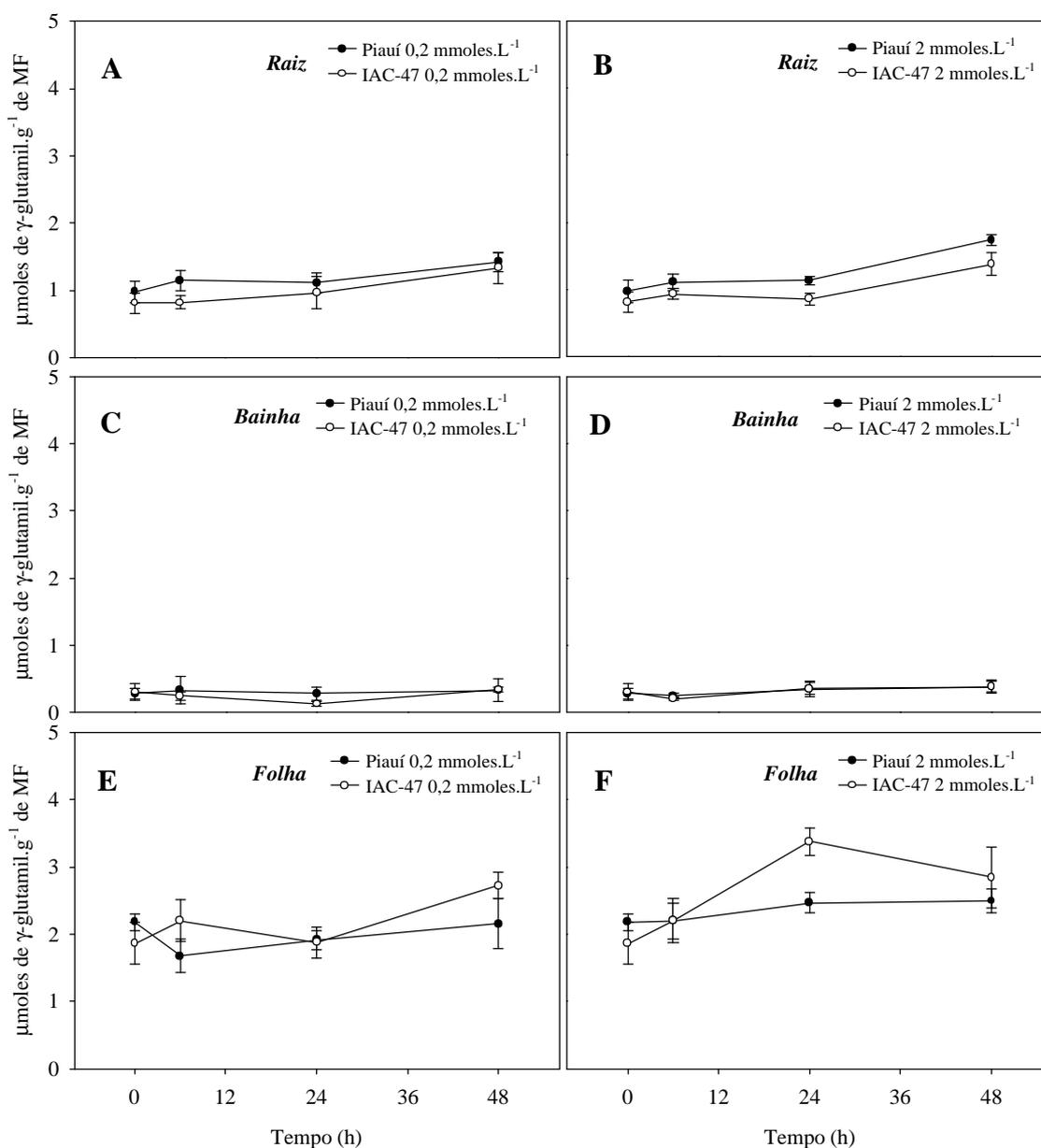


Figura 16. Atividade da Glutamina Sintetase (GS) nas raízes, bainhas e folhas das variedades Piauí e IAC-47 submetidas a 0,2 e 2 mmoles L⁻¹ de N-NO₃⁻ depois de 72 horas de privação deste nutriente.

Nota-se nas bainhas, que a atividade da NR e GS (Figura 13 e 16) são extremamente reduzidas se comparada com os outros tecidos da planta. Por outro lado, as bainhas apresentam os maiores teores de NO₃⁻ acumulado na planta (Figura 15). Especialmente na dose de 2 mmoles.L⁻¹ de NO₃⁻, há um grande acúmulo desse nutriente nas bainhas, onde o trânsito deste nutriente não se reflete em atividade da NR. Estes dados sugerem mais uma vez que as bainhas são tecidos especializados para o acúmulo

de nitrato e portanto pode ser considerado um tecido pouco ativo para redução e assimilação deste nutriente.

Essas baixas atividades da NR nas bainhas também pode ser um indicativo de que as células deste tecido possuam um pequeno volume citosólico, ou que esta enzima seja pouco expressa neste tecido. Estes dados estão de acordo com o observado no experimento anterior realizado com a variedade Caiapó.

Em todas as partes da planta não se observam grandes aumentos no conteúdo de N-Amino (

Figura 17) a partir do tempo zero (momento em que as plantas se encontravam com 72 horas sem nitrato), podendo ser notada até mesmo uma pequena queda a partir das 6 horas. Estes dados sugerem que as plantas não se encontravam sob estresse por falta de N, ou mesmo, que a remobilização do NO_3^- armazenado foi suficiente para manter elevados os teores de N-amino.

Outro fato a ser observado é que inicialmente os valores de N-Amino livre é maior na variedade Piauí em todas as partes da planta. Se observarmos os teores de açúcares solúveis (Figura 18), podemos notar que a variedade Piauí mantém níveis mais elevados que a IAC-47, e esta pode ser uma das explicações pelas quais também se observa maiores teores de N-amino livre na var. Piauí, principalmente nas folhas, já que para formação de N-Amino são necessários esqueletos de carbono.

Uma maior eficiência energética das plantas da variedade Piauí, associada a um melhor controle da remobilização, pode ser a causa dos maiores teores de N-amino no período inicial do ensaio, ou seja, quando as plantas se encontravam com 72 h de privação de N. Estes resultados reforçam os dados obtidos anteriormente no laboratório de nutrição mineral de plantas da UFRural-RJ, que assume ser as variedades tradicionais de arroz, mais eficientes no uso do N quando comparadas às melhoradas.

Sabemos que há uma estreita correlação entre o metabolismo de nitrogênio e carbono nas plantas, portanto uma maior eficiência energética, se traduz quase que obrigatoriamente numa maior eficiência no uso do N, pois os processos de absorção, translocação, redução e remobilização deste nutriente é dependente de energia metabólica. Há gasto de poder redutor e ATP para as enzimas envolvidas nesse processos.

Nota-se, principalmente nas folhas, que após a adição de nitrato, ao invés de ocorrer um aumento nos teores de N-Amino (

Figura 17), há uma diminuição. Isso pode se decorrente da baixa radiação luminosa na qual as plantas estavam submetidas. A energia gasta nos processos de absorção e redução do NO_3^- pode ser uma das explicações pela qual se observa queda nos teores de N-amino, já que os esqueletos de carbono produzidos foram utilizados para geração de ATP e poder redutor necessário para estes processos.

A redução nos teores de N-amino, mesmo após a adição de NO_3^- é um indicativo de que os processos de absorção, translocação e redução deste nutriente é forte dreno de energia, capaz de alterar o metabolismo de carbono das plantas. No entanto, vale notar que essa observação só foi possível de ser observada devido à baixa radiação luminosa em que as plantas foram submetidas (em torno de $80 \mu\text{moles} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$).

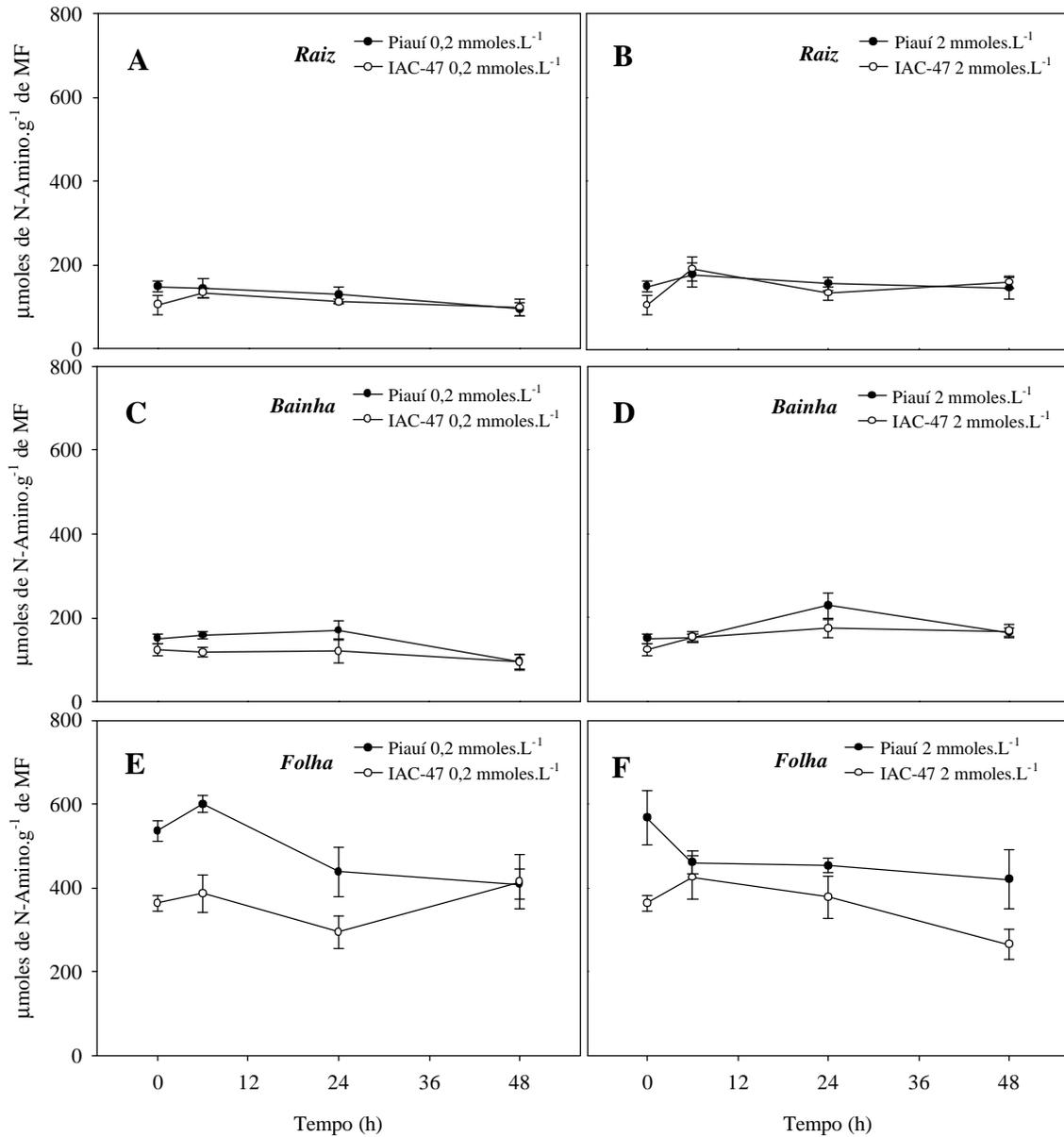


Figura 17. Teores de N-Amino nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO₃⁻ (0,2 e 2 mmol.L⁻¹) depois de 72 horas de privação deste nutriente.

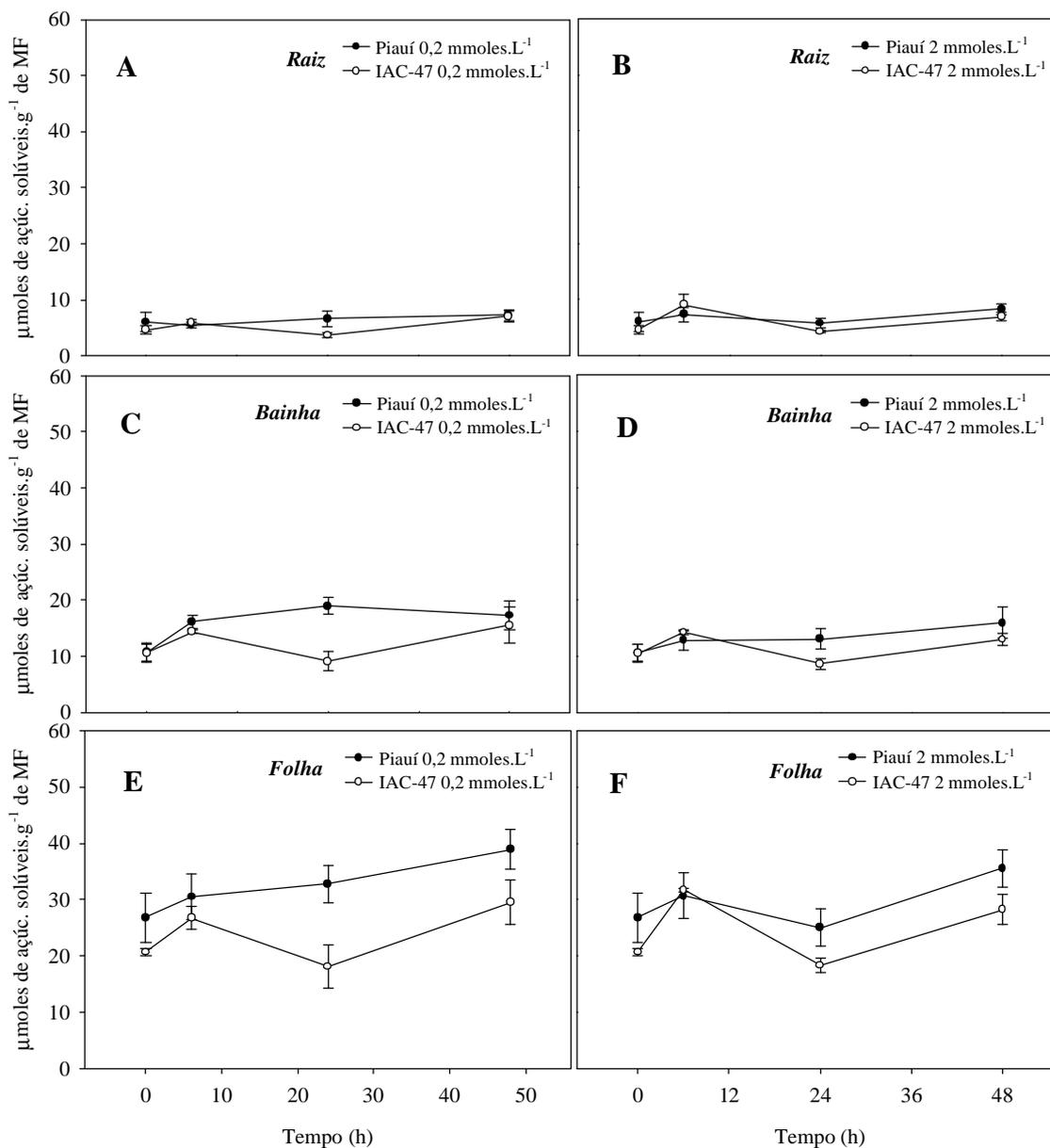


Figura 18. Teores de açúcares solúveis nas raízes, bainhas e folhas de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) submetidas a duas doses de N-NO_3^- (0,2 e 2 mmoles.L^{-1}) depois de 72 horas de privação deste nutriente.

4.3 Dinâmica de Remobilização do Nitrato (Var. Piauí)

Nota-se na Figura 19 que no momento inicial (0h), quando as plantas ainda se encontravam com nitrato em solução, os maiores níveis de ANR são observados nas raízes. Isto indica que a raiz foi o principal órgão envolvido no processo de redução do N-NO_3^- absorvido, nesta fase de desenvolvimento da planta e nas condições que o experimento foi conduzido.

Com a retirada do nitrato da solução nutritiva há uma queda brusca na atividade da nitrato redutase (ANR) nas raízes. Nas folhas e bainhas observa-se comportamento semelhante nas primeiras 24h depois de retirada no N externo, embora a atividade inicial tenha sido menor que nas raízes. Após este período observa-se uma tendência de

aumento na ANR. Estes resultados confirmam que com a retirada do nitrato da solução externa há uma rápida diminuição no fluxo interno deste íon, o que causa uma queda na ANR (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995).

A ANR preferencial nas raízes na coleta feita no tempo zero (Figura 19), pode entre outras coisas ser devido à baixa luminosidade a que as plantas estavam submetidas ($80 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Segundo Andrews et al. (2004), o principal local de assimilação do NO_3^- pode ser a raiz ou a parte aérea, dependendo do genótipo e das condições ambientais. Por exemplo, este mesmo autor mostra que a assimilação de NO_3^- na parte aérea é uma desvantagem sob condições de baixa temperatura.

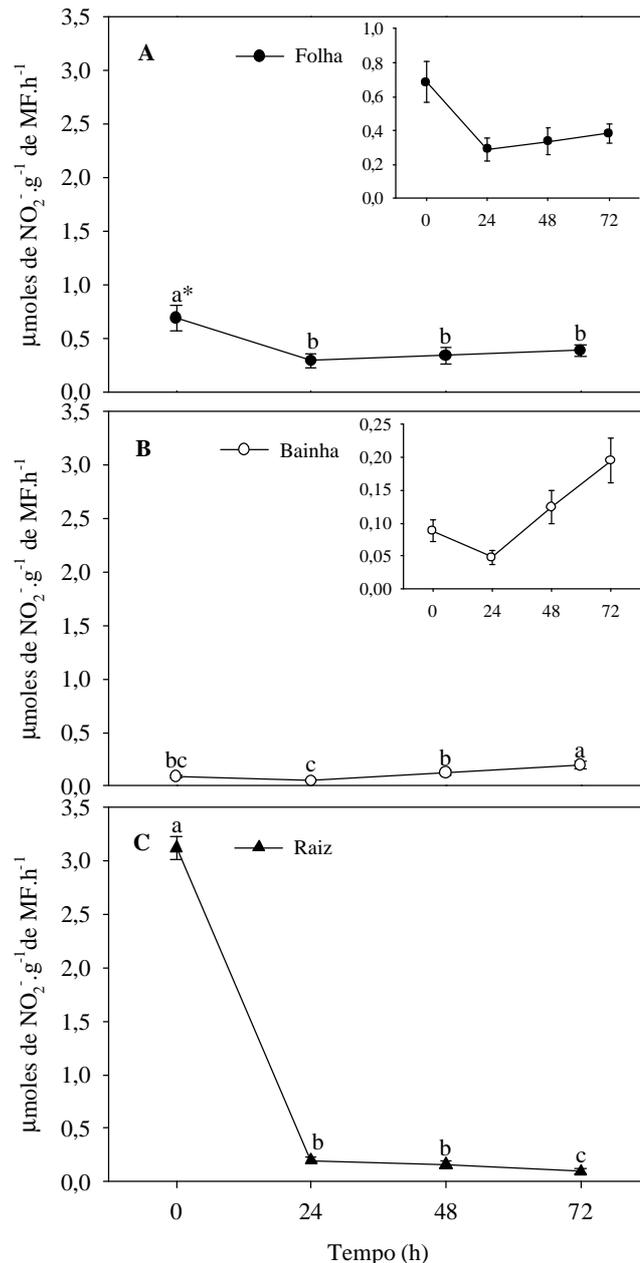


Figura 19. Atividade da Nitrato Redutase nas folhas (A), bainhas (B) e raízes (C) de plantas de arroz (var. Piauí) após retirada da fonte externa de N-NO_3^- da solução nutritiva durante 72 h.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Entre 24 h e 72 h depois da retirada do NO_3^- da solução externa observa-se um leve aumento na ANR nas bainhas, o que pode ser atribuído ao processo de remobilização do NO_3^- armazenado nos vacúolos desse tecido. De maneira diferente do observado nas bainhas, as raízes não apresentam uma retomada da atividade da nitrato redutase, havendo sempre uma queda na ANR até as 72 horas.

Nas folhas, a ANR permaneceu constante após as 24 horas sem NO_3^- , e se mostrou superior à atividade observada nas bainhas e raízes após as 48 horas sem NO_3^- (Figura 19). Como mostrado no item 4.1 de Resultados e Discussão, o nitrato remobilizado das bainhas foi provavelmente reduzido nas folhas, e talvez por isso, a ANR se mostrou maior neste tecido a partir das 48h sem NO_3^- .

Em todas as partes da planta houve um decréscimo contínuo e significativo no conteúdo de N-NO_3^- , mostrando haver uma ininterrupta utilização do NO_3^- acumulado (Figura 20 A). Nota-se também, que nas raízes, a queda no conteúdo de nitrato nas primeiras 24 h é mais rápida do que nas folhas e bainhas. Entre 0 e 72 horas, ocorre uma queda de 81,6% no conteúdo de NO_3^- das raízes, 73,4% das folhas, e apenas 48,5% nas bainhas, podendo este fato estar associado aos altos valores de ANR das raízes nas primeiras horas do ensaio.

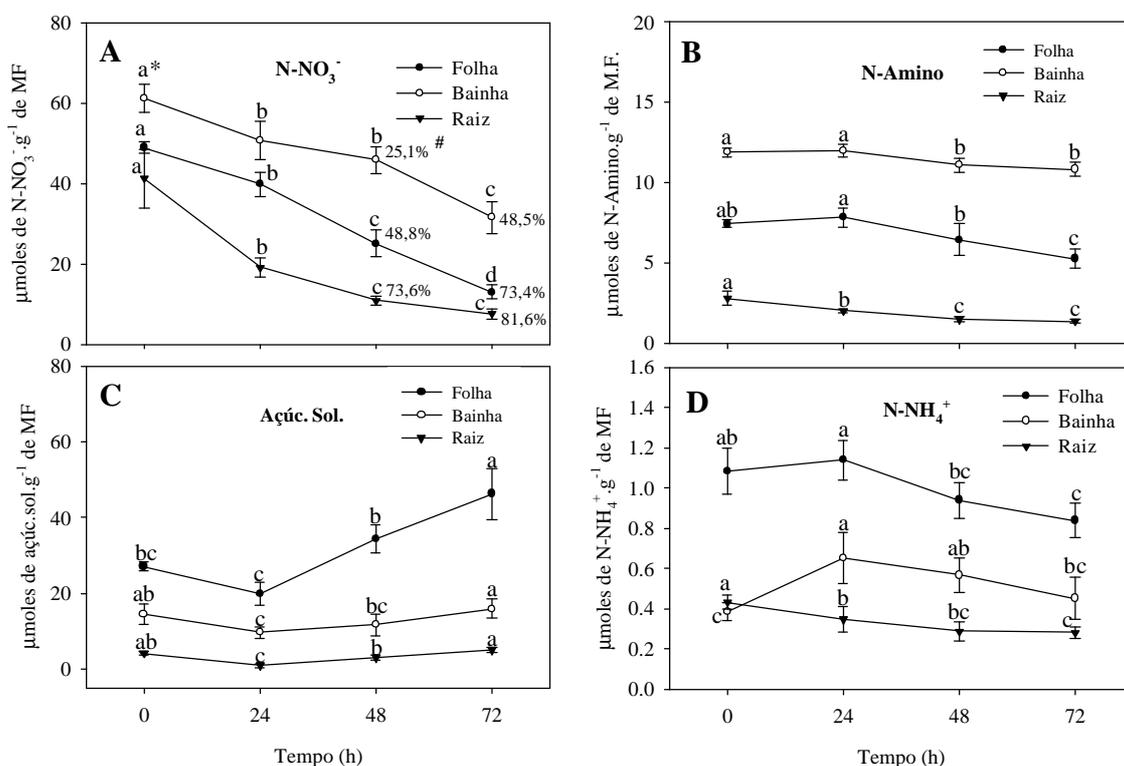


Figura 20. Teores de N-NO_3^- (A), N-Amino (B), açúcares solúveis (C) e N-NH_4^+ (D) nas folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz (var. Piauí) após retirada da fonte externa de N-NO_3^- da solução nutritiva durante 72h. # Percentagem de redução do teor de NO_3^- relativo ao valor inicial (0 h).

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Outro fato a ser observado é que a queda contínua do conteúdo de N-NO_3^- nas raízes é acompanhada por uma queda também progressiva na atividade da NR. Por outro lado, nas folhas e bainhas a queda no conteúdo de NO_3^- nos tecidos não

acompanha uma queda progressiva na ANR, havendo uma retomada da ANR nesses órgãos a partir das 24h (Figura 19 e Figura 20A).

Com a diminuição dos teores de NO_3^- nos tecidos da planta, esperava-se um aumento nas concentrações de açúcares solúveis em função de uma economia de esqueletos de carbono que não seriam utilizados para a assimilação do N. No entanto, nas primeiras 24 h depois da retirada do suprimento externo de N houve uma diminuição significativa dos teores de açúcares solúveis em todas as partes da planta (Figura 20C). Como será mostrado adiante, a diminuição do conteúdo de NO_3^- nas primeiras 24h correlaciona-se negativamente com a atividade das H^+ -ATPases, que mostra um pico de atividade neste mesmo intervalo de tempo (Figura 23).

Nota-se também, que após a retirada da fonte externa de N há uma redução nos teores de N-Amino das raízes nas primeiras 24 h, enquanto que, nas folhas e bainha só se observa uma redução significativa após 48h (Figura 20B). Este fato pode ser devido aos maiores teores de N- NO_3^- encontrados nos tecidos das folhas e bainhas (Figura 20A).

O aumento nos teores de N- NH_4^+ livre na bainha confirma a tendência da ANR (Figura 20), enquanto ocorrem reduções nas folhas e raízes.

Nota-se na Figura 21A um aumento significativo da atividade das P- H^+ -ATPases nas primeiras 24 horas após a retirada do NO_3^- da solução nutritiva. Os resultados do experimento com a variedade Caiopó (Figura 22A) mostrou que após a retirada do nitrato da solução nutritiva houve uma indução do crescimento radicular. Isto sugere que o aumento na atividade das P- H^+ -ATPases na variedade Piauí pode também ter sido devido à acidificação do apoplasto para promoção do crescimento radicular, admitindo-se que tenha ocorrido nesta variedade crescimento radicular semelhante ao observado para a variedade Caiapó (Figura 22A).

Existem evidências da participação das P- H^+ -ATPases no controle do ciclo celular, balanço osmótico, e expansão celular via acidificação da parede celular induzida por auxinas (KALAMPANAYL & WIMMERS, 2001). Portanto, este aumento na massa fresca radicular acompanhado por um aumento na atividade das P- H^+ -ATPases sugere a participação dessas enzimas no processo de crescimento radicular.

Observa-se na Figura 22B, que o conteúdo de NO_3^- nas folhas e bainha das plantas que permanecem com o suprimento externo de nitrato se mantém elevados, enquanto que os teores observados nas plantas após retirada do NO_3^- da solução diminuem continuamente. Esta diminuição no conteúdo de NO_3^- nos tecidos das plantas pode ser o sinal para aumento no crescimento radicular.

Os dados apresentados na Figura 21A e Figura 22A sugerem que a retirada do nitrato da solução nutritiva foi percebida pela planta, como sinal para indução das P- H^+ -ATPases. Nota-se na Figura 22A que sob condição de privação de N, há um estímulo ao crescimento radicular que se torna mais evidente a partir das 48 h horas após esgotamento do suprimento externo de N- NO_3^- .

A Figura 21C mostrou que há um aumento na atividade das H^+ -PPases dependentes de K^+ após a retirada do N- NO_3^- da solução nutritiva. De maneira similar ao observado para as H^+ -PPases, também há um aumento na atividade das V- H^+ -ATPases, no entanto em proporções bem menores (Figura 21B).

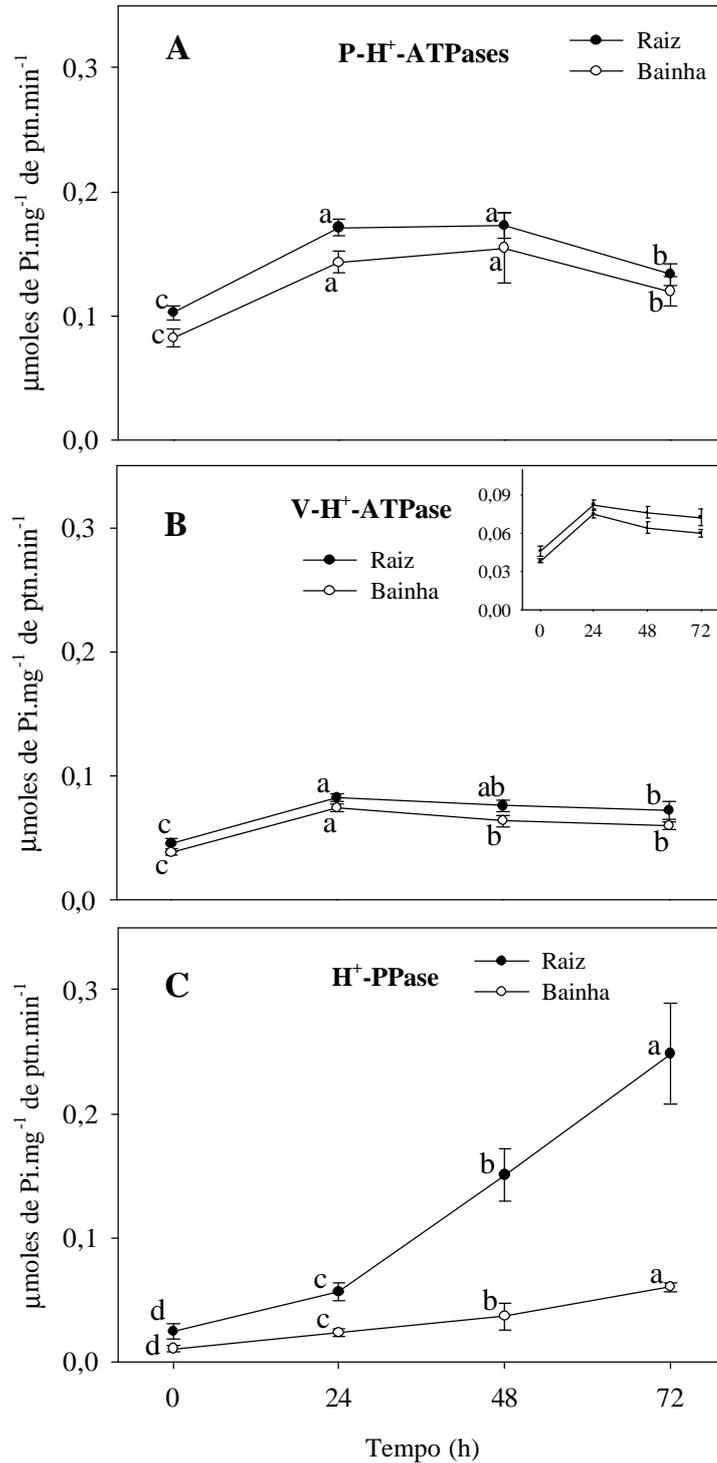


Figura 21. Atividade das P-H⁺-ATPases (A), V-H⁺-ATPases (B) e H⁺-PPases (C) nas raízes e bainhas de plantas de arroz (var. Piauí) após retirada da fonte externa de N-NO₃⁻ da solução nutritiva durante 72 h.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

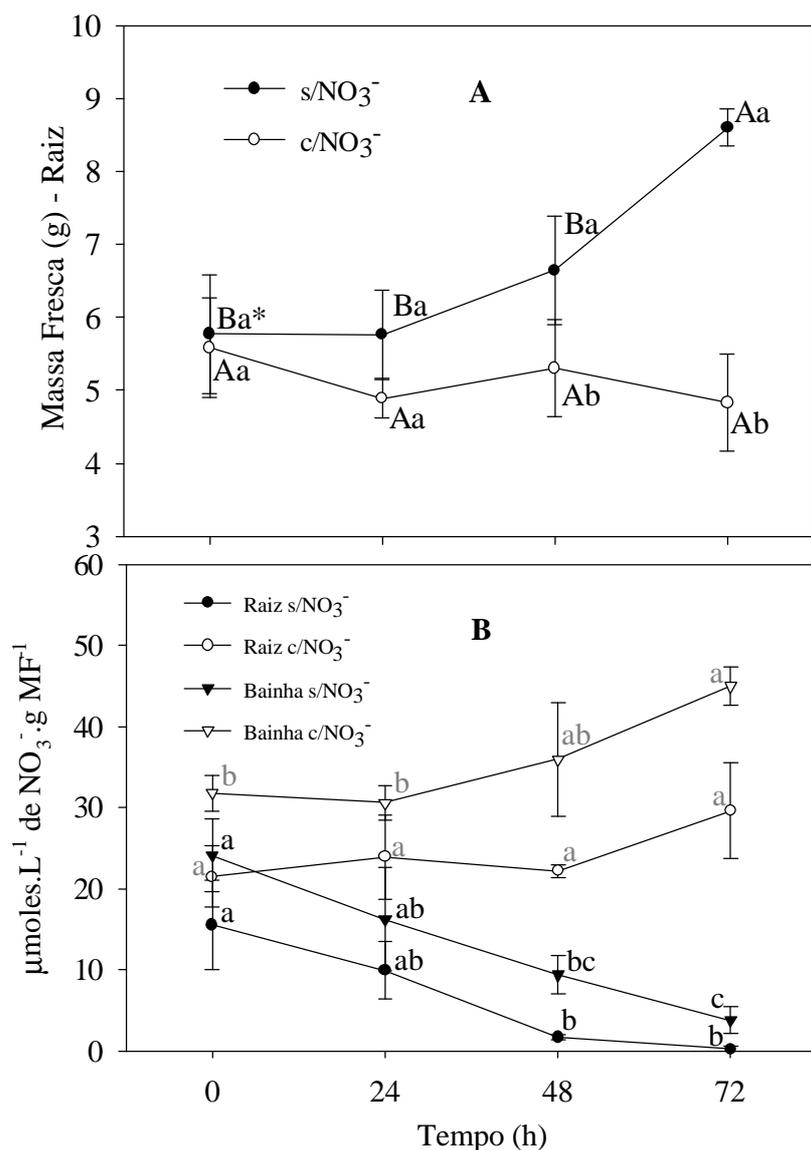


Figura 22. Massa fresca de raízes (A) e concentração de nitrato nas raízes e bainhas (B) de arroz (var. Caiapó) com suprimento de NO₃⁻ esgotado e com 2 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ em solução nutritiva durante 72 h.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A- maiúscula dentro dos tratamentos e minúscula entre os tratamentos B- comparação dentro dos tratamentos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que após a retirada do nitrato da solução nutritiva, houve aumento da atividade das H⁺-PPases e também das P-H⁺-ATPases, estando portanto de acordo com os resultados obtidos por LI et al. (2005).

O conteúdo e a atividade relativamente altos de H⁺-PPases da membrana vacuolar de tecidos em crescimento foram observados em feijão de corda, quando em comparação com as partes maduras do hipocótilo (MAESHIMA, 1990). Há confirmação de que isto seja devido a uma ativa transcrição dos genes para as H⁺-PPases (NAKANISHI & MAESHIMA, 1998). Estes resultados também foram observados em nosso experimento, onde pode ser notado um aumento na quantidade de proteína com tamanho aproximado de 73 kDa que pode ser atribuída as H⁺-PPases (Figura 24). Este aumento observado no gel relaciona-se positivamente com os níveis de atividade hidrolítica de PPI (Figura 21C).

SMART et al. (1998) investigaram as mudanças nas enzimas-chave envolvidas no desenvolvimento de fibras de algodão depois da antese. Os genes para H⁺-PPases foram constantemente transcritos e a atividade das H⁺-PPases mudaram drasticamente durante o alongamento celular com pico em poucos dias depois do pico na taxa de alongamento da fibra. Altos níveis de atividade das H⁺-PPase também foram observados em tecidos jovens de fruto de pêra (SHIRATAKE et al., 1997). Diante das evidências da participação da H⁺-PPases no processo de crescimento e divisão celular observado em diversos estudos anteriores, a elevada atividade desta enzima observada neste trabalho, refletem realmente o seu alto conteúdo.

Em frutos de pêra e hipocótilos de feijão de corda, a atividade das H⁺-PPases é muitas vezes maior que a atividade das V-H⁺-ATPases (MAESHIMA, 2000). Como pode ser notado na Figura 21C, elevados valores de atividade das H⁺-PPases comparados com as V-H⁺-ATPases são observados em situações em que espera-se um aumento do crescimento radicular (Figura 22A), embora também tenha havido um aumento na atividade das V-H⁺-ATPase (Figura 21B).

A diminuição dos teores de açúcares solúveis observada na Figura 20C para a variedade Piauí, podem em parte ser explicados pelo aumento na atividade das V-ATPases (Figura 21B) que mostra uma correlação negativa com os teores de açúcares solúveis nas raízes e bainhas (Figura 23). Estes resultados mostram que as H⁺-ATPases são fortes drenos de energia metabólica e que um aumento na sua atividade em função de uma necessidade espontânea pode diminuir sensivelmente os teores de carboidratos na planta, quando cultivadas sob baixa luminosidade.

MAESHIMA & YOSHIDA (1989) purificaram uma H⁺-PPase a partir de membranas vacuolares de *Vigna radiata* e demonstraram que esta enzima apresentava, em gel de poliacrilamida uma massa molecular de 73 kDa. SARAFIAN & POOLE (1989) purificaram uma H⁺-PPase de beterraba que apresentava um peso molecular de 67 kDa, bem próximo ao encontrado por MAESHIMA & YOSHIDA (1989). De maneira geral, as H⁺-PPases de tonoplasto em plantas terrestres contêm de 761 a 771 resíduos de aminoácidos com uma massa molecular calculada de 80-81 kDa e, tamanho aparente em gel de poliacrilamida de 70 a 73 kDa. Assim como estes autores, os tamanhos das proteínas identificados por nós como sendo H⁺-PPases estão em torno de 73 kDa (Figura 24).

Apesar de não ter sido utilizado os anticorpos específicos para estas proteínas, as conclusões são ainda válidas, já que foi feita a purificação de membranas do tonoplasto e as V-H⁺-ATPases e H⁺-PPases podem participar com até 10% e 30% do total de proteínas presentes na membrana vacuolar respectivamente (Teodoro, 2004).

Como pode ser observado nas figuras (Figura 21B, Figura 21C e Figura 24) após a retirada do NO₃⁻ da solução nutritiva, é percebido um aumento na atividade tanto das V-H⁺-ATPases quanto das H⁺-PPases assim como aumento na quantidade de proteínas com tamanho 73 kDa, 67 kDa e 58 kDa as quais podem ser atribuídas, respectivamente, a H⁺-PPases, subunidade A das V-H⁺-ATPases ou H⁺-PPases e subunidade B das V-H⁺-ATPases.

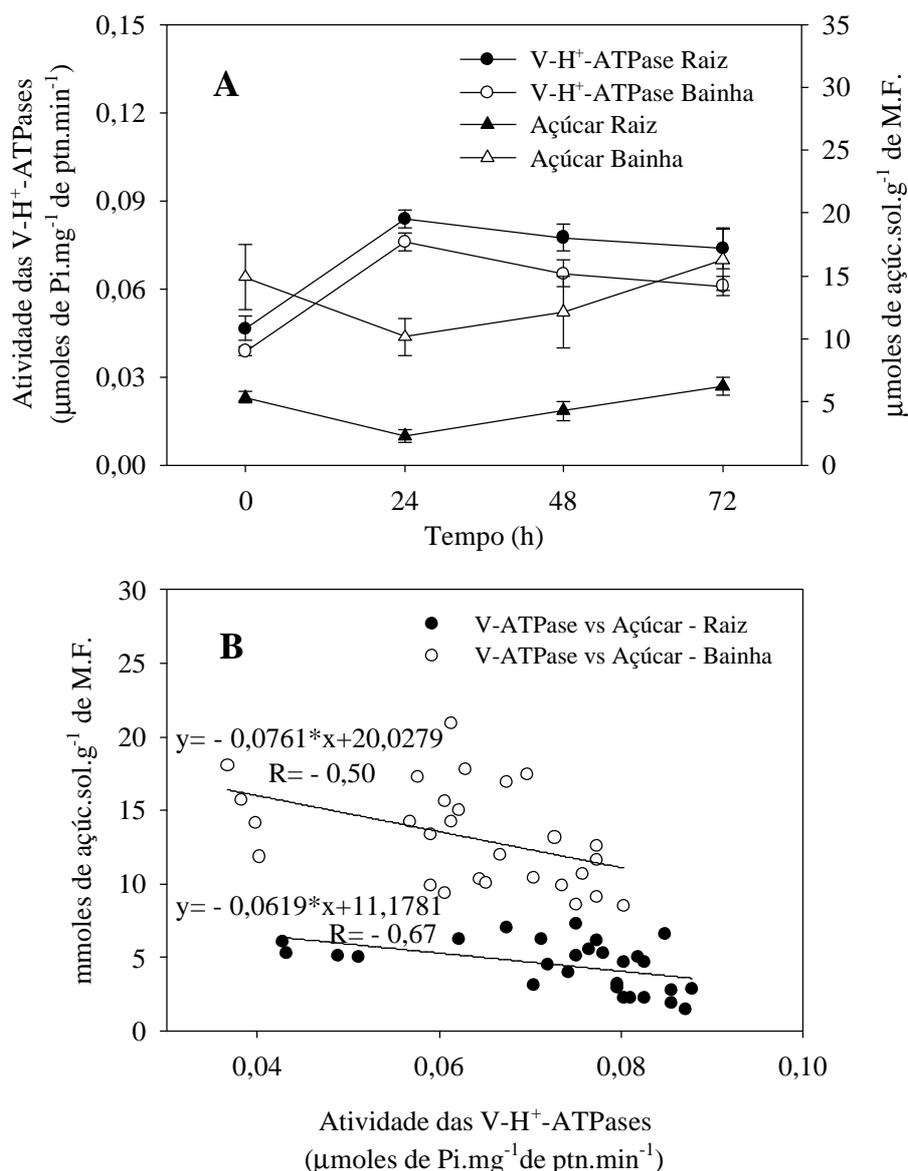


Figura 23. Atividade das V-H⁺-ATPases e teores de açúcares solúveis. Visualização de uma correlação negativa entre essas variáveis. (A)-médias com desvios e (B)-regressão linear.

Segundo Maeshima (2000) as H⁺-PPases consistem de um único polipeptídeo de 67 kDa ou 73 kDa, confirmado em SDS-PAGE. Portanto, é possível que no gel apresentado na Figura 24 tenha havido sobreposição das bandas referentes às H⁺-PPases e subunidade A das V-H⁺-ATPases.

Acompanhando o aumento na abundância das V-H⁺-ATPases e H⁺-PPases, pode ser observado um aumento na quantidade de proteínas com tamanho de 23 kDa. Estas proteínas são as mais abundantes nas membranas vacuolares das plantas e são conhecidas como aquaporinas. O aumento na quantidade desta proteína pode ter sido necessário para aumentar o fluxo de água para o interior do vacúolo e dessa forma contribuir para a expansão e divisão celular. Segundo SMART et al. (1998) as plantas podem alterar tanto a abundância como a atividade de aquaporinas para modular o fluxo transmembrana de água.

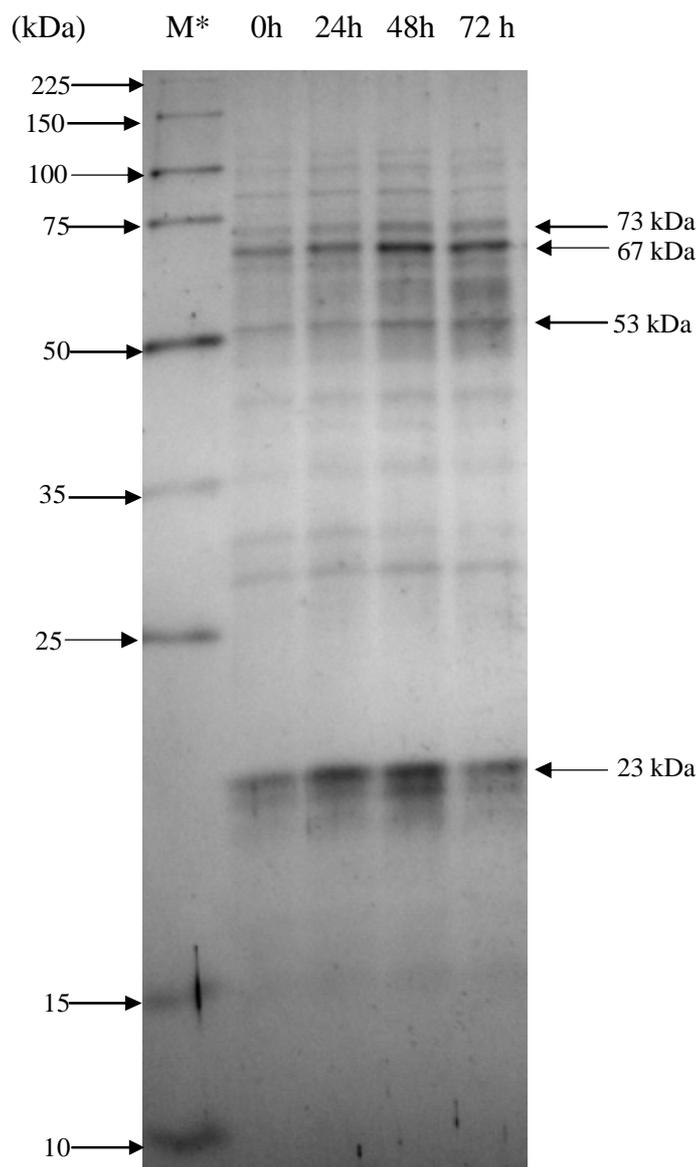


Figura 24. SDS-PAGE de proteínas isoladas de membranas do tonoplasto nas raízes de plantas de arroz (var. Piauí) depois de retirada da fonte externa de N-NO_3^- da solução nutritiva durante 72 h. *M=Marcador.

Devido aos intensos processos de biossíntese que podem ter ocorrido, principalmente pelo crescimento radicular, como observado nas raízes da variedade Caiapó depois da retirada do NO_3^- , tendo como consequência uma grande produção de PPI, pode-se supor que a hidrólise desse PPI pelas H^+ -PPases ocorreu não somente para remobilização do NO_3^- acumulado no vacúolo, mas também para o acúmulo de solutos necessária à expansão dos vacúolos no processo de crescimento e divisão celular. Os resultados mostrados nas Figura 21C e Figura 20 indicam ser este o caso, pois não há correlação entre a atividade das H^+ -PPases para remobilização do NO_3^- e atividade das NR para redução do N remobilizado nas raízes. Por outro lado, nas bainhas, o aumento na atividade das H^+ -PPases é acompanhado por uma queda proporcional no conteúdo de nitrato neste tecido (Figura 20).

Pelo fato das plantas de arroz neste experimento estarem em fase de crescimento vegetativo e submetidas a um ambiente de baixa radiação luminosa (condições experimentais), a produção e ou disponibilidade de esqueletos de carbono, pelo menos em parte, pode comprometer a produção de ATP, e explicar a baixa atividade das V-H⁺-ATPases comparada as H⁺-PPases

As PPases de uma ampla variedade de organismos podem ser divididas em três classes: PPases solúveis, PPase associada à membrana, e H⁺-PPase. Somente a H⁺-PPase entre estes três tipos de PPases tem a habilidade de transportar prótons através da membrana (MAESHIMA, 2000). Tem sido argumentado que H⁺-PPase é a bomba predominante em tecidos jovens que contém um elevado conteúdo de pirofosfato oriundo da alta atividade biossintética desses tecidos.

Os resultados obtidos sugerem a participação das P-H⁺-ATPases no processo de crescimento radicular sinalizado pela retirada do N-NO₃⁻ da solução nutritiva e a participação das V-H⁺-ATPases e principalmente das H⁺-PPases nos processos de transporte de solutos para dentro do vacúolo necessário para o crescimento e a expansão celular.

O fato de não ter sido observado uma recuperação da atividade da NR nas raízes depois da retirada do N-NO₃⁻, como fruto de uma remobilização digerida por um gradiente de H⁺ gerado pelas V-H⁺-ATPases e/ou H⁺-PPases, pode estar associada a uma baixa concentração deste íon observado neste tecido quando comparado com as bainhas e folhas após 24 horas (Figura 20A). A atividade das H⁺-PPases parece estar relacionado ao transporte de solutos para o interior do vacúolo como pré-requisito para o crescimento e expansão celular necessário ao desenvolvimento radicular observado.

4.4 Dinâmica de Remobilização de Nitrato (Comparação entre Piauí e IAC-47)

Ao contrário do observado nas raízes das plantas da variedade Piauí (Figura 21A), a atividade das P-H⁺-ATPases na variedade IAC-47 (Figura 25) é maior na presença de NO₃⁻. Este fato pode ser atribuído a uma resposta adaptativa diferenciada entre estas variedades, onde a variedade Piauí “percebe” a retirada brusca do NO₃⁻ como um sinal de estresse que culmina em resposta ao aumento do sistema radicular em busca do nutriente, explicando a maior atividade das P-ATPases no tratamento onde houve a retirada da fonte externa de NO₃⁻.

As H⁺-PPases são geralmente tidas como enzimas abundantes em tecidos jovens e também com enzima marcadora de estresse. MAESHIMA & YOSHIDA (1989) em estudos com feijão observaram aumento tanto na atividade quanto na quantidade desta enzima quando as plantas foram submetidas a anoxia ou ao frio. Se para a variedade Piauí a retirada do nitrato foi percebida pela planta como um sinal de estresse traduzido em um elevado aumento na atividade das V-PPases (Figura 21C) o mesmo não foi observado para a IAC-47, que mostra atividades das H⁺-PPases muito baixa após 48 horas da retirada do nitrato da solução, não diferindo do controle com permanência de NO₃⁻ a 2 mmol L⁻¹ em solução nutritiva (Figura 26A).

Quanto as V-ATPases, assim como a variedade Piauí a IAC-47 também apresentou um aumento de atividade hidrolítica após 48 horas da retirada da fonte externa de NO₃⁻. Este comportamento é esperado para as duas variedades, pois depois da retirada da fonte externa do NO₃⁻, espera-se que as plantas busquem remobilizar o nitrato estocado no vacúolo, o que acontece através de transportadores em simporte com um H⁺ (NO₃⁻/H⁺), este fornecido as custas de energia metabólica pelas V-H⁺-PPases.

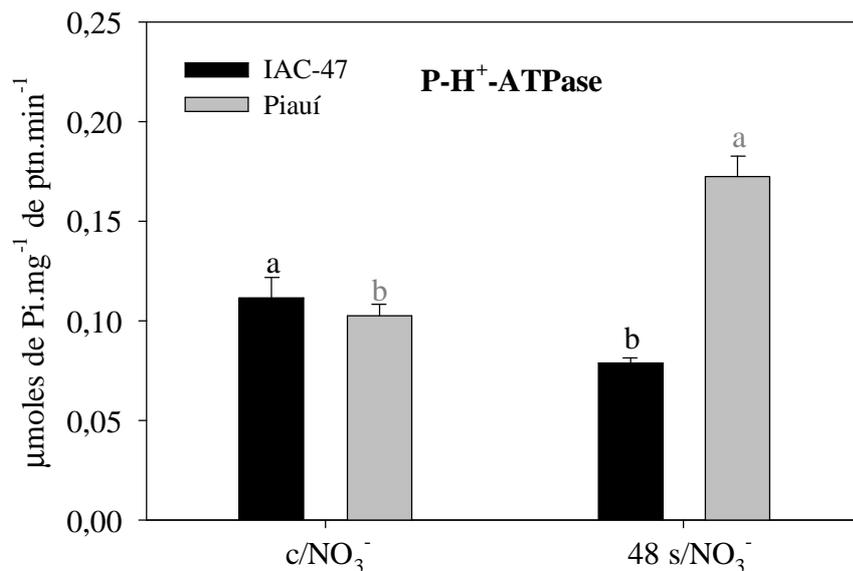


Figura 25. Atividade das P-H⁺-ATPases nas raízes de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 em presença de 2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ e após tratamento com 48h de privação de NO₃⁻ em solução nutritiva.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

Um fato interessante quanto à atividade hidrolítica das V-ATPases entre as variedades Piauí e IAC-47, é que para a variedade Piauí, as maiores atividades são observadas na raiz, enquanto que a IAC-47 tem as maiores atividades nas bainhas.

Como pode ser observado na Figura 20A, após a retirada do nitrato da solução nutritiva, a variedade Piauí remobilizou apenas 25,1% do nitrato que havia inicialmente estocado nas bainhas até as 48 horas, enquanto que a variedade IAC-47 remobilizou 37,3% (Tabela 6) neste mesmo intervalo de tempo. Os maiores valores de atividade hidrolítica das V-H⁺-ATPases observadas nas bainhas da variedade IAC-47 refletiu numa maior quantidade de NO₃⁻ remobilizado.

Sabemos que a bainha é o tecido preferencial para acúmulo de nitrato em plantas de arroz. Sendo assim, a estratégia da variedade Piauí em remobilizar preferencialmente o nitrato presente nas raízes é uma maneira de poupar o NO₃⁻ presente nos tecidos das bainhas (local especializado para o seu acúmulo e, portanto presente em maior quantidade). Esta pode ser uma estratégia da variedade Piauí no intuito de preservar o N estocado para uso futuro e uma das explicações pelas quais a variedade Piauí apresenta maior teor de proteína bruta nos grãos.

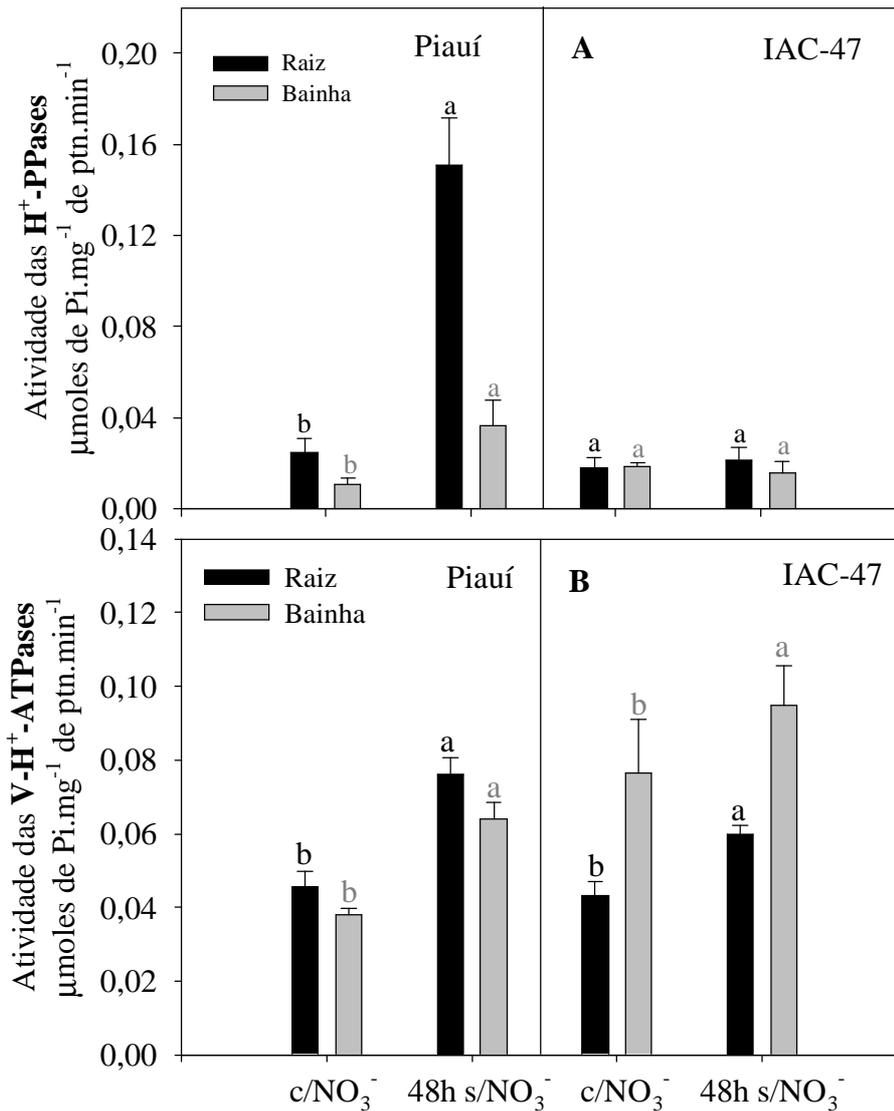


Figura 26. Atividade das H⁺-PPases (A) e V-H⁺-ATPases (B) nas raízes e bainhas de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 na presença de 2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ e após tratamento com 48h de privação de NO₃⁻ em solução nutritiva.

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F (p<0,05).

Já a variedade IAC-47, selecionada para ambientes com suprimento adequado de N apresenta as maiores atividades das V-ATPases nas bainhas, sendo isto provavelmente uma forma de remobilizar mais rapidamente o NO₃⁻ estocado, pois são nas bainhas que se concentram as maiores quantidades de nitrato. Este comportamento quando em condições de privação de N pode levar a uma exaustão muito rápida das reservas de N (NO₃⁻) e, portanto comprometer o teor de proteínas nos grão ainda a serem formados.

Nas folhas, a remobilização também é um pouco maior na variedade IAC-47 (54,8%) quando comparada à variedade Piauí e de 48,8%. Nas raízes, por outro lado os valores de remobilização são bem próximos, 73,6% na variedade Piauí contra 70,3% na var. IAC-47.

Tabela 6. Teores de N-NO₃⁻, N-Amino, açúcares solúveis e N-NH₄⁺ nas folhas, raízes e bainhas de plantas de arroz (var. IAC-47) na presença de 2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ e após tratamento com 48h de privação de NO₃⁻ em solução nutritiva.

Parte da Planta	N-NO ₃ ⁻ (μmol g ⁻¹ MF)	
	2 mmol L ⁻¹ de NO ₃ ⁻	48 h sem NO ₃ ⁻
	Média*	Média
Folha	27,33 ± 1,93	12,35 ± 3,14
Raiz	26,65 ± 2,58	7,90 ± 2,15
Bainha	46,45 ± 6,99	29,13 ± 1,48
N-amino (μmol g ⁻¹ MF)		
Folha	8,94 ± 0,86	7,19 ± 0,61
Raiz	3,15 ± 0,54	1,62 ± 0,35
Bainha	3,84 ± 0,54	2,18 ± 0,38
Açúcares solúveis (μmol g ⁻¹ MF)		
Folha	25,35 ± 1,18	23,77 ± 1,52
Raiz	3,44 ± 0,36	2,96 ± 0,44
Bainha	8,32 ± 0,71	9,55 ± 0,84
N-NH ₄ ⁺ (μmol g ⁻¹ MF)		
Folha	0,60 ± 0,08	0,37 ± 0,02
Raiz	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,04
Bainha	0,37 ± 0,06	0,39 ± 0,04

*Médias de quatro repetições ± o desvio padrão da média

4.5 Exemplo do Efeito de KNO₃ sobre a Atividade das P-H⁺-ATPases

O púrpuro de bromocresol é um indicador misto de pH que assume uma coloração arroxeadada quando em pH acima de 6 e se torna amarelo quando em pH mais ácido, permitindo desta forma o monitoramento das mudanças de pH na rizosfera.

O vanadato é um inibidor específico das P-ATPases, e portanto, na sua presença não é possível observar qualquer indício de acidificação rizosférica (Figura 27C) pelo bloqueio total da atividade das P-ATPases. Quanto à situação observada na Figura 27B, a leve acidificação pode ser atribuída aos processos de absorção de SO₄²⁻, Ca²⁺ e outros como o próprio crescimento radicular. O fato é que, quando na presença de NO₃⁻ o processo de acidificação é muito mais intenso, podendo então ser observada uma forte coloração amarela em toda a superfície do sistema radicular das plantas (Figura 27A).

SANTI et al. (1995) em estudos realizados com milho, verificaram maiores atividades hidrolíticas das P-ATPases quando as plantas eram crescidas em meio contendo nitrato em relação às plantas crescidas em meio sem a presença deste nutriente. Estes mesmos autores também propõem que esta maior atividade pode ser devido ao menos em parte a uma maior expressão dessa enzima quando da presença de N. Vale ressaltar que tanto neste caso como no realizado por SANTI et al. (1995) foram utilizadas plântulas de poucos dias de idade as quais apresentam tais resultados em resposta ao primeiro contato com o NO₃⁻ em altas concentrações depois de apenas duas a três horas. A coloração do meio após algumas horas volta a ficar arroxeadada (dados não mostrados) em virtude da absorção do NO₃⁻ que ocorre junto com os prótons bombeados pelas P-H⁺-ATPases.

A acidificação observada neste ensaio foi apenas transitória, com um máximo após seis horas do início do ensaio e redução a partir de então. Em virtude disso, propomos que o aumento da atividade das H⁺-ATPases foi uma resposta à acidificação

citoplasmática inesperada proveniente da absorção do nitrato presente no meio. Depois de algumas horas já não há mais variação da coloração do meio, neste momento parece haver um equilíbrio entre os prótons absorvidos junto com o nitrato e os bombeados pelas P-H⁺-ATPases (o meio fica permanentemente arroxado).

Sabe-se que o nitrato é um ânion que encontra barreiras tanto elétricas (interior da célula é mais negativo) quanto químicas (concentração citoplasmática de NO₃⁻ esta em torno de 5 a 30 mmol L⁻¹, enquanto que na solução do solo a concentração deste ânion chega no máximo a 5 mmol L⁻¹) para sua absorção. Sabemos também que a absorção de NO₃⁻ se dá em simporte com dois prótons (NO₃⁻/2H⁺) através de transportadores de alta e baixa afinidade. Sendo assim, para que haja a absorção deste nutriente é necessária a manutenção de um gradiente de prótons, gerando uma força próton motriz que viabilize o transporte de NO₃⁻ para o interior da célula.

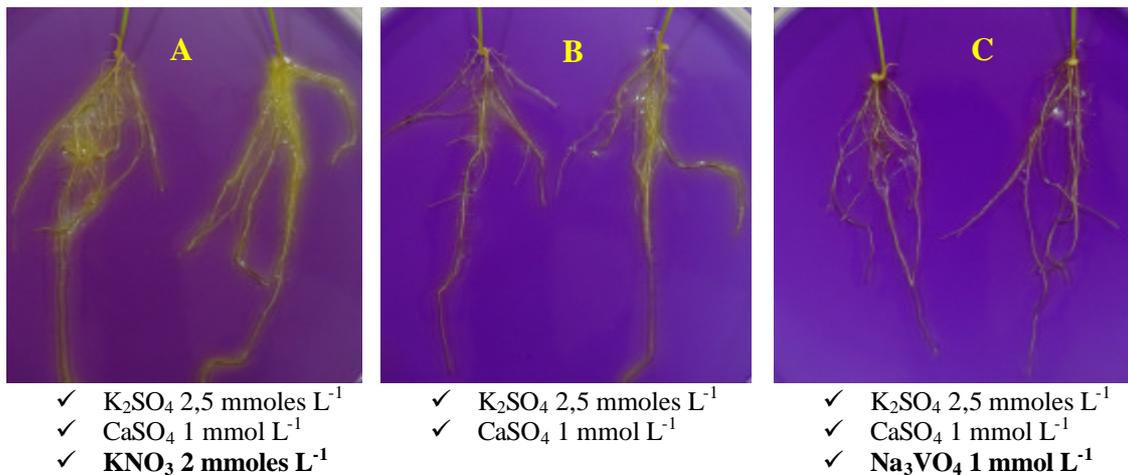


Figura 27. Demonstração do efeito do NO₃⁻ sobre a acidificação da rizosfera de plantas de arroz, variedade Piauí.

5. CONCLUSÕES

Na fase inicial de crescimento das plantas de arroz da variedade Caiapó ocorre acúmulo de nitrato na bainha foliar, enquanto que nas raízes e folhas o NO_3^- é assimilado em maior intensidade. Sob condição normal de N na solução nutritiva a atividade da nitrato redutase é muito baixa nas bainhas, caracterizando esse tecido como especializado em armazenar o NO_3^- em excesso. Somente após a depleção de N da solução nutritiva a planta começa a remobilizar o NO_3^- que está armazenado principalmente nas bainhas, para suprir as necessidades de nitrogênio do vegetal.

Os resultados obtidos no experimento de remobilização sugerem a participação das P-H^+ -ATPases no processo de crescimento radicular sinalizado pela retirada do N-NO_3^- da solução nutritiva e a participação das V-H^+ -ATPases e principalmente das H^+ -PPases nos processos de transporte de solutos para dentro do vacúolo necessário para o crescimento e a expansão celular. As elevadas atividades das H^+ -PPases parecem esta relacionada ao mecanismo de crescimento e expansão celular necessário ao desenvolvimento radicular observado.

As plantas da variedade Piauí remobiliza preferencialmente o nitrato presente nos tecidos radiculares, enquanto que a IAC-47 remobiliza o nitrato das bainhas. Dessa forma a variedade Piauí poupa o nitrato presente nas bainhas, tecido considerado pool de reserva de nitrato, garantindo dessa forma a presença deste nutriente por mais tempo na fase de desenvolvimento mais adiante.

As plantas da variedade Piauí apresentam C_{min} inferior ao da IAC-47. Dessa forma, a var. Piauí consegue absorver o nitrato presente no solo em concentrações mais baixas quando comparada a IAC-47.

Os valores mais altos de atividade da NR, GS e acúmulo de NO_3^- nos tecidos radiculares observados na variedade Piauí quando comparada a var. IAC-47 se caracterizam uma estratégia de economia de esqueletos de carbono, resultando em maiores teores de N-Amino e açúcares solúveis nas folhas da var. Piauí.

As P-H^+ -ATPases não mostraram grandes variações de atividade após adição do NO_3^- , indicando que esta enzima participa do processo de absorção de NO_3^- apenas para manutenção do pH citosólico alterado pela absorção desse nutriente que se dá junto com dois H^+ .

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento dos processos fisiológicos e bioquímicos que afetam a absorção, translocação, acúmulo e remobilização de N pelas plantas são informações que podem explicar os mecanismos de eficiência no uso de N pelas plantas. Nos estudos realizados nesta dissertação foi possível observar que há uma diferença no padrão de absorção e remobilização de N entre variedades tradicionais e melhoradas de arroz.

Enquanto que no processo de remobilização a var. IAC-47 mantinha uma maior atividade das V-H⁺-ATPases nas bainhas, a var. Piauí apresentou as maiores atividades nas raízes. Sendo as bainhas o sítio preferencial para o acúmulo de nitrato, a maior atividade destas bombas de prótons neste tecido resultou numa maior quantidade de N-NO₃⁻ remobilizado na variedade IAC-47, quando comparada à variedade Piauí. Esta informação sugere que a variedade Piauí possui um maior controle no processo de remobilização resultando em maiores teores de N nas fases mais adiantadas do seu desenvolvimento, podendo por fim gerar grãos com maior teor de proteína.

Quanto ao processo de absorção, foi possível observar que a variedade Piauí, apresentou C_{min} inferior ao observado para variedade IAC-47. Isso sugere que o sistema de alta afinidade para absorção de nitrato da variedade Piauí é mais eficiente que o da variedade IAC-47.

Aparentemente a variedade Piauí apresenta uma maior eficiência na utilização de energia metabólica quando comparada a IAC-47. A estratégia de redução e acúmulo de nitrato preferencialmente nas raízes pela var. Piauí é uma maneira de evitar gasto de energia que ocorre do envio deste nutriente para parte aérea. No entanto, vale ressaltar que as plantas foram crescidas sob baixa radiação luminosa (aprox. 80 umoles de fótons m⁻² s⁻¹).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREWS, M.; MORTON, J. D.; LEIFFERING, M.; BISSET, L. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of a range of temperate cereals and pasture grasses. **Annals of Botany**, v.70, p.271-276, 1992.
- ANDREWS, M.; LEA, P. J.; RAVEN, J. A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Analytical Applied Biology**, v.154, p.25-40, 2004.
- 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.
- 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.
- BALTSCHIEFFSKY, M.; SCHULTZ, A.; BALTSCHIEFFSKY, H. H⁺-PPase: a tightly membrane-bound family. **FEBS Letters**, v.457, p.527-533, 1999.
- BAPTISTA, A. de J.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, R. de S. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular das cultivares de arroz Agulha e Bico Ganga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.7, p.1325-1330, 2000.
- 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).
- BENNETZEN, J. L.; M. A., J. X. The genetic colinearity of rice and other cereals on the basis of genomic sequence analysis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.2, p.128-133, 2003.
- BLUMWALD, E. Sodium transport and salt tolerance in plants. **Current Opinion in Cell Biology**, v.12, p.431-434, 2000.
- BOWMAN, E. J.; SIEBERS, A.; ALTENDORF, K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPase from microorganisms, animal cells, and plant cells. **Proceedings National Academic Science**, USA, v.85, p.7972-7976, 1988.
- 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.
- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L. FAÇANHA, A. R. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Maize Roots. **Plant Physiology**, v.130, p.1951-1957, 2002.
- 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, v.6, p.853-855, 1975.
- CRAWFORD, N. M. & GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, v.3, n.10, p.389-395, 1998.

- CRIDER, B. P.; XIE, X.-S.; STONE, D. K. Bafilomycin inhibits proton flow through the H⁺ channel of vacuolar proton pump. **Journal of Biology Chemistry**, v.269, p.17379-17381, 1994.
- DEITZ, K. J.; TAVAKOLI, N.; KLUNGE, C.; MIMURA, T.; et al. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. **Journal of Experimental Botany**, Bielefeld, Germany, v.52, n.363, p.1969-1980, 2001.
- DETTMER, J.; SCHUBERT, D.; CALVO-WEIMAR, O.; STIERHOF, Y.-D.; SCHMIDT, R.; SCHUMACHER, K. Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. **The plant Journal**, v.41, p.117-124, 2005.
- DUBOIS, F.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALES-MORO, M.-B. ESTAVILLO, J.-M.; SANGWAN, R.; GALLAIS, A.; HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new store for an old enzyme? **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.565-576, 2003.
- FAÇANHA, A. R.; & MEIS, L. de. Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. **Plant Physiology**, Rio de Janeiro, v.116, p.1487-1495, 1998.
- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. **In: BERGSEN, F. J. Ed. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, 1980.
- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, 1980, 1977.
- FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, v.34, p.9-18, 1984.
- FERNANDES, M. S.; & ROSSIELLO, R. O. P. Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, n.2, p.111-148, 1995.
- FINBOW, M. E. & HARRISON, M. A. The vacuolar H⁺-ATPase: A universal proton pump of eukaryotes. **Biochemical Journal**, v.324, p.697-712, 1997.
- FORDE, B.G. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, v.53, p.203–224, 2002a.
- FORDE, B.G. The role of long-distance signaling in plant responses to nitrate and other nutrients. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.366, p.39-43, 2002b.
- GAXIOLA, R. A.; FINK, G. R.; HIRSCHI, K. D. Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. **Plant Physiology**, v.129, p.967–973, 2002.
- GIANNINI, J. L.; BRISKIN, D. P. Proton transport in plasma-membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue - A comparative study of ion effects on Delta-pH and Delta-PSI. **Plant Physiology**, Urbana, IL, USA, v. 84, n.3, p.613-618, 1987.
- GLASS, A. D. M.; SHAFF, J. E. & KOCHIAN, L. V. Studies of the uptake of nitrate in barley. 4.Electrophysiology. **Plant Physiology**, Rockville, v.99, n.2, p.456-463, 1992.

- GLASS, A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: Physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, n.5, p.453-470, 2003.
- GOWRI, G.; KENIS, J. D.; INGEMARSSON, B.; REDINBAUGH, M. G.; CAMPBELL, W. H. Nitrate reductase transcript is expressed in the primary response of maize to environmental nitrate. **Plant Molecular Biology**, v.18, p.55-64, 1992.
- HAMILTON, C. A.; GOOD, A. G.; TAYLOR, G. J. Induction of vacuolar ATPase and mitochondrial ATP synthase by aluminium in an aluminum-resistant cultivar of wheat. **Plant Physiology**, v.125, p.2068-2077, 2001.
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; et al. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1258-1270, 2001.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Stn. Bull**, v.347, p.1-32, 1950.
- HUBER, S. C.; MACKINTOSH, C.; KAISER, W. M. Metabolic enzymes as targets for 14-3-3 protein. **Plant Molecular Biology**, v.50, p.1053-1063, 2002.
- HU-CHENG, Z.; TING, Z.; JIA, W.; BAO-SHU, X. : Effect of Ca-2+ on H+-ATPase activity of plasma membrane in wheat root. **Colloids and Surfaces B-biointerfaces**. V.28, n.2-3, p.147-152, 2003.
- IZAWA, T. & SHIMAMOTO, K. Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. **Trends in Plant Science**, v.1, n.2, p.95-99, 1996.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research. Communication**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- KALAMPANAYIL, B. D, WIMMER, L. E. Identification and characterization of salt-stress-induced plasma membrane H⁺-ATPase in tomato. **Plant Cell and Environment**, v.24, p.999-1005, 2001.
- KANCZEWSKA, J.; MARCO, S.; VANDERMEEREN, C.; MAUDOUX, O.; RIGAUD, J-L.; BOUTRY, M. Activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. **PNAS**, v.102, n.33, p.11675-11680, 2005.
- KAWASAKI-NISHI, S.; NISHI, T.; FORGAC, M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. **FEBS Letter**, Boston, MA, USA, v.545, p.73-85, 2003.
- KING, B.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. Studies of the uptake of nitrate in barley. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity: implications for nitrate influx. **Plant Physiology**, v.99, p.1582-1589, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.555-564, 2003.
- LEIJ, M van der; SMITH, S. J.; MILLER, A. J. Remobilization of vacuolar stored nitrate in barley root cells. **Planta**, v.205, p.64-72, 1998.
- LI, J.; YANG, H.; PEER, W. A.; RICHTER, B. J.; et al. Arabidopsis H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development. **Science**, v.130, p.121-125, 2005.

- LI, M-G.; VILLEMUR, R.; HUSSEY, P. J.; SILFLOW, C. D.; GANTT, J. S.; SNUSTAND, D. P. Differential expression of sis glutamine synthase genes in *Zea mays*. **Plant Molecular Biology**, v.23, p.410-417, 1993.
- LIN, H.; SALUS, S. S.; SCHUMAKER, K. S. Salt sensitivity and the activities of the H⁺-ATPases in cotton seedlings. **Crop Science**, v.37, p.190-197, 1997.
- LÓPEZ-BUCIO, L.; CRUZ-RAMÍREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulation root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, p.280-287, 2003.
- MACCDUF, J. M.; JARVIS, S. C.; MASQUERA, A. Nitrate nutrition of grasses from steady-state supplies in following solution culture following nitrate deprivation and/or defoliation. II. Assimilation of NO₃⁻ and short-term effects on NO₃⁻ uptake. **Journal of Experimental Botany**, v.40, p.977-984, 1989.
- MAESHIMA, M. Development of vacuolar membranes during elongation of cells in mung bean hypocotyls. **Plant Cell Physiology**, v.31, p.311-317, 1990.
- MAESHIMA, M. Tonoplast Transporters: Organization e function. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Nagoya, Japan, v.52, p.469-497, 2001.
- MAESHIMA, M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. **Biochemica et Biophysica Acta**, Nagoya, Japan, v.1465, p.37-51, 2000.
- MAESHIMA, M.; YOSHIDA, S. Purification and properties of the V-PPases from mung bean. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.20068-20073, 1989.
- MARTINOIA, E.; MASSONNEAU, A.; FRANGNE, N. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. **Plant Cell Physiology**, v.41, n.11, p.1175-1186, 2000.
- MATT, P.; GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; KRAPP, A.; SITTI, M. The immediate cause of the diurnal changes of nitrogen metabolism in leaves of nitrate-replete tobacco: a major imbalance between the rate of nitrate reduction and the rates of nitrate uptake and ammonium metabolism during the first part of the light period. **Plant Cell and Environment**, v.24, p.170-190, 2001.
- MOCKAITIS, K.; HOWELL, S. H. Auxin induces mitogenic activated protein kinase (MAPK) activation in roots of Arabidopsis seedlings. **Plant Journal**, v.24, n.7, p.85-96, 2000.
- MÜLLER, C.; SCHEIBLE, W-R.; STITT, M.; KRAPP, A. Influence of malate and 2-oxoglutarate on the NIA transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. **Plant Cell and Environment**, v. 24, p. 191-203, 2001.
- NAKANISHI, Y.; MAESHIMA, M. Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. **Plant Physiology**, v.116, p.589-597, 1998.
- PADMANABAN, S.; LIN, X.; PERERA, I.; KAWAMURA, Y.; SZE, H. Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. **Plant Physiology**, v.134, p.1514-1526, 2004.

- PALMGREN, M. G. Plant plasma membrane H⁺-ATPase: powerhouses for nutrient uptake. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.817-845, 2001.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T. & MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1023-1031, 2003.
- RATAJCZAK, R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1465, p.17-36, 2000.
- RATAJCZAK, R.; RICHTER J.; LUTTGE, U. Adaptation of the tonoplast V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C3-CAM transition and plant age. **Plant, Cell and Environment**, v.17, p.1101-1112, 1994.
- REA, P. A.; POOLE, R. J. Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.44, p.157-180, 1993.
- RODRIGUES, F. de S.; SOUZA, S. R.; RODRIGUES, F. de S.; FERNANDES, M. S. Nitrogen metabolism in rice cultivated under seasonal flush of nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.3, p.395-409, 2004.
- RÖMHELD, V.; MÜLLER, C. H.; MARSCHNER, H. Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. **Plant Physiology**, v.76, p.603-606, 1984.
- SANDHU, D.; GILL, K. S. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes. **Plant Physiology**, v.128, n.3, p.803-811, 2002.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma membrane H⁺-ATPase in maize roots induced for NO₃⁻ Uptake. **Plant Physiology**, v.109, p.1277-1283, 1995.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R.; AND VARANINI, Z. Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 389, p. 1851-1864, 2003.
- SARAFIAN, V.; POOLE, R. J. Purification of a H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. **Plant Physiology**, v.91, p.34-38, 1989.
- SATTELMACHER, B.; GERENDAS, J.; THOMS, K.; BRUCK, H.; BAGDADY, N. H. Interaction between root growth and mineral nutrition. **Environmental and Experimental Botany**, v.33, p.63-73, 1993.
- SCHACHTMAN, D. P.; SCHROEDER, J. I. Structure and transport mechanism of a high-affinity potassium uptake transporter from higher plants, **Nature**, v.370, p.655-658, 1994.
- SCHEIBLE, W. R.; GONZALEZ-FONTES, A.; LAUERER, M.; MÜLLER-RÖBER, B.; CABOCHE, M.; SITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell**, v.9, p.783-798, 1997.

- SHIMAOKA, T.; OHNISHI, M.; SAZUKA, T.; MITSUHASHI, N.; et al. Isolation of intact vacuoles and proteomic analyses of tonoplast from suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiology**, v.45, n.6, p.672-683, 2004.
- SHIRATAKE, K.; KANAYAMA, Y.; MAESHIMA, M.; YAMAKI, S. Changes in H⁺-pumps and a tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. **Plant Cell Physiology**, v.38, p.1035-1045, 1997.
- SMART, L. B.; VOJDANI, F.; MAESHIMA, M. WILKINS, T. A. Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. **Plant Physiology**, v.116, p.1539-1549, 1998.
- SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v.136, p.2475-2482, 2004.
- SOUZA, S. R. de. Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteína em grãos de arroz. **Tese de Doutorado**, UFRRJ: Seropédica, Brasil, 1995. 152p.
- SOUZA, S. R., STARK, E. M. L. M., FERNANDES, M. S. e MAGALHÃES, J. R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crude protein of rice. **Communication Soil Science and Plant Analyses**, v.30, n. 5 e 6, p.711-724, 1999.
- SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M.; RUTH, T. J. & RUFTY, T. Studies of the uptake of nitrate in barley: I. Kinetics of ¹³NO₃⁻ influx. **Plant Physiology**, v.93, p.1426-1432, 1990.
- STÖHR, C.; STRUBE, F.; MARX, G.; ULLRICH, W. R.; ROCKEL, P. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. **Planta**, v.212, n.8, p.35-41, 2001.
- SZE, H.; SCHUMACHER K.; MULLER, M. L.; PADMANABAM, S.; TAIZ, L. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. **Trends in Plant Science**, v.7, n.4, p.157-161, 2002.
- TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 3.Ed, Porto Alegre: Artmed, 2004.
- TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄. UFRGS. 1982. 23p.
- TEODORO, C. E. de S. Bombas protônicas de organelas da via secretória: Comparação entre leveduras e plantas. **Tese de Doutorado**, UENF: Campos dos Goytacases, Brasil, 2004. 151p.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant Cell and Environment**, v.23, p.1005-1024, 2000.
- VIDMAR, J. J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M. Y.; SCHJOERRING, J. K.; TOURAINE, B. & GLASS, A. D. M. Isolation and characterization of *HvNRT2.3* and *HvNRT2.4*, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of *Hordeum vulgare*. **Plant Physiology**, v.122, p.783-792, 2000.
- WANG, B.; LUTTGE, U.; RATAJCZAK, R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.365, p.2355-2365, 2001.

- WANG, H.; GARVIN, D. F. & KOCHIAN, L. V. Nitrate-induced genes in tomato roots. Array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v.127, p.345-359, 2001.
- WILLIAMS, L. E. & MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.659-688, 2001.
- WIRÉN, N. V.; GAZZARRINI, S.; FROMMER, W. B. Regulation of mineral uptake in plants. **Plant and Soil**, v.196, p.191-199, 1997.
- YAN, F.; ZHU, Y.; MULLER, C.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiology**, v.129, p.50-63, 2002.
- YANG, S., MAESHIMA, M., TANAKA, Y. e KOMATSU, S. Modulation of vacuolar H⁺-pumps and aquaporin by phytohormones in rice seedling leaf sheaths. **Biology Pharmacology Bulletin**, V.26, n.1, p.88-92, 2003.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, v.80, p.209-213, 1955.
- YEMM, E. W. e WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochemistry**, v.57, p.508-514, 1954.
- ZHANG, H.; FORDE, B. G. An arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, v.279, p.407-409, 1998.
- ZHANG, H.; FORDE, B. G. Regulation of arabidopsis root development by nitrate availability. **Journal of Experimental Botany**, v.51, p.51-59, 2000.
- ZHANG, H.; JENNINGS, A.; BARLOW, P. V.; FORDE, B. G. Dual pathway for regulation of root branching by nitrate. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v.96, p.6529-6534, 1999.
- ZHUO, D.; OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J. & GLASS, A. D. M. Regulation of a putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, v.17, n.5, p.563-568, 1999.

8. ANEXOS

PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE PARA A EXTRAÇÃO DAS VESÍCULAS DE PLASMALEMA E TONOPLASTO

- ✓ **Estoque PMSF (200 mM)** – pesar 1,742 g de PMSF e diluir em 50 mL de etanol absoluto ou DMSO. Pode ser armazenada a temperatura ambiente.
- ✓ **Estoque Tris-HCl 0,5M pH 8,0**– pesar 12,11g de Tris base e diluir em 170 mL com água deionizada. Corrigir o pH com HCl concentrado (usa-se bastante) até 8,0. Completar o volume para 200 mL e armazenar em geladeira. É o Tampão para o preparo do meio de homogeneização.
- ✓ **Estoque Tris-HCl 0,5M pH 7,5** – pesar 12,11g de Tris base e diluir em 170 mL com água deionizada. Corrigir o pH com HCl concentrado (usa-se bastante) até 7,5. Completar o volume para 200 mL e armazenar em geladeira.
- ✓ **Estoque de EGTA 0,1M pH 7,5** – pesar 3,8035 g de EGTA e diluir em 80 mL com água deionizada. Corrigir o pH com KOH 10N para 7,5. A medida que o pH se aproximar de 7,5 é recomendado diluir o KOH. Completar o volume para 100 mL e armazenar em geladeira.
- ✓ **Estoque de EDTA 0,1M pH 7,5** – pesar 3,7232 g de EGTA e diluir em 80 mL com água deionizada. Corrigir o pH com KOH 10N para 7,5. A medida que o pH se aproximar de 7,5 é recomendado diluir o KOH. Completar o volume para 100 mL e armazenar em geladeira.
- ✓ **Estoque de β -mercaptoetanol 0,5M** – pipetar 3,52 mL de mercaptoetanol concentrado e completar o volume para 100 mL com água deionizada. Pode ser armazenada a temperatura ambiente hermeticamente fechado.
- ✓ **MgCl₂ 0,1M** – pesar 1,016g de MgCl₂ e dissolver em 50 mL com água deionizada. Armazenar em geladeira
- ✓ **DTT** – PM (Peso Molecular) = 154,25 g. A quantidade de DTT é determinada (pesada) no momento do preparo da solução de acordo com o volume e concentração de DTT da solução em questão.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO (500 ML)

- ✓ Adicionar inicialmente 50 mL de Tris-HCl 0,5M pH 8,0 (**50mM**), em seguida adicionar 42,8 g de sacarose (**250mM**) e água para ajudar a dissolver a sacarose, adicional 50 mL de glicerol (**10%**), 10 mL de EGTA 0,1M pH 7,5 (**2mM**), 10 mL de EDTA 0,1M pH 7,5 (**2mM**), 12,45 g de KI (**150mM**), 6,95 g de cloreto de colina (**100 mM**) e 5 g de PVP (**1%**). Completar o volume para 500 mL com água deionizada e certificar que o pH está em torno de 8,0. **Esta solução deve ser armazenada em frízer e pode ser utilizada por meses.**

Obs.: Albumina (**0,5%**), DTT (**5mM**), mercaptoetanol (**5mM**) e PMSF (**1mM**) devem ser adicionados no momento da preparação de acordo com o volume a ser preparado do meio de extração.

ESTOQUE MEIO DE RESSUSPENSÃO (100 mL)

- ✓ Primeiramente adicionar 6 mL de Tris-HCl 0,5M pH 7,5 (**30mM**), em seguida adicionar água, 15 mL de glicerol (**15%**), 1 mL de EGTA 0,1M pH 7,5 (**1mM**), 1 mL de EDTA 0,1M pH 7,5 (**1mM**) e 2 mL de MgCl₂ 0,1 M (**2mM**), completar o volume para 100 mL com água deionizada e certificar que o pH está em torno de 7,5. **Esta solução deve ser armazenada em frízer e pode ser utilizada por meses.**

Obs.: DTT (**2mM**) e PMSF (**1mM**) devem ser adicionados no momento da ressuspensão de acordo com o volume a ser preparado.

SOLUÇÕES PARA O GRADIENTE DE SACAROSE (43% E 27%) (100 mL)

- ✓ Primeiramente adicionar 10 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 (**50mM**), em seguida adicionar 43g de sacarose (**se 43%**) ou 27g de sacarose (**se 27%**), 1 mL de EGTA 0,1M pH 7,5 (**1mM**), 1 mL de EDTA 0,1M pH 7,5 (**1mM**) e 2 mL de MgCl₂ 0,1 M (**2mM**), completar o volume para 100 mL com água deionizada e certificar que o pH está em torno de 7,5. **Esta solução deve ser armazenada em frízer e pode ser utilizada por meses.**

Obs.: DTT (**2mM**) e PMSF (**1mM**) devem ser adicionados no momento do preparo do gradiente de acordo com o volume a ser preparado.

PREPARO DA SOLUÇÃO DE BRADFORD

- ✓ Em um Becker de 1000 mL, adicionar 100 mg de coomassie blue G-250 diluído em 50 mL de etanol 95%; sob esta solução adicionar 850 mL de água, agitar, e logo depois adicionar 100 mL de H₃PO₄ 85%. Aferir o volume em balão volumétrico e deixar agitando por algumas horas com auxílio de bala magnética.
- ✓ Esta solução deve ser filtrada duas vezes em papel de filtro (1^a -apenas uma camada e 2^a - duas camadas de papel de filtro). Pode-se também usar bomba de vácuo para auxiliar no processo de filtragem. Armazenar a solução em frasco de vidro na geladeira.

Obs.: A água deve ser adicionada sempre antes do ácido fosfórico.

PREPARO DO PADRÃO DE PROTEÍNA

Estoque BSA (Albumina de Soro Bovino) - (1mg/mL) – pesar 0,1 g e diluir em 100 mL com água deionizada. Aliquotar em alguns tubos ependoff e armazenar em frízer - 20°C por meses.

Tubos	[BSA] (mg/mL)	Est. BSA (uL)	H ₂ O (uL)	Alíquota (uL)	Sol. Bradford (mL)
1	0	0	400	60	3
2	0,05	20	380	60	3
3	0,1	40	360	60	3
4	0,15	60	340	60	3
5	0,20	80	320	60	3
6	0,30	120	280	60	3
7	0,40	160	240	60	3
8	0,50	200	200	60	3
9	0,60	240	160	60	3

Obs.: Fazer tanto o padrão quanto as dosagens de proteínas em triplicatas.

Para certificar-se da qualidade da solução estoque de BSA, esta deverá ser lida em cubeta de quartzo (comprimento de onda 280 nm), onde a leitura deve estar em torno de 0,600 ou muito próximo disso, caso contrário, a solução deverá ser novamente preparada.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA (BRADFORD, 1976)

- ✓ Geralmente é necessário fazer uma diluição da amostra, pode variar de 5 a 20 vezes.
- ✓ Adicionar em tubos de ensaio 60 uL da amostra.
- ✓ Em seguida adicionar 3 mL da solução de Bradford.
- ✓ Esperar cerca de 10 min e ler em 595 nm.

PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE PARA ATIVIDADE DAS P- E V- H⁺-ATPASES E DAS H⁺-PPASES

OBS.: Todas as soluções abaixo descritas devem ser armazenadas em geladeira, exceto aquelas que contêm as instruções escritas logo após o modo de preparo.

- ✓ **MgSO₄ 0,1M** (50 mL) - Pesar 1,2324g de MgSO₄ e diluir em 50 mL de água deionizada.
- ✓ **KCl 1M** (100 mL) - Pesar 7,456g de KCl e diluir em 100 mL de água deionizada.
- ✓ **Na₂MoO₄.4H₂O 0,1M** (25 mL) - Pesar 0,6049g de Na₂MoO₄.4H₂O e diluir em 25 mL de água deionizada.
- ✓ **Triton X-100 1%** (50 mL) - Pipetar 0,5 mL de Triton X-100 e diluir em 50 mL de água deionizada.
- ✓ **KNO₃ 1M** (50 mL) - Pesar 5,055g de KNO₃ e diluir em 50 mL de água deionizada.

- ✓ **NaN₃ 0,1M** (50 mL) - Pesar 0,3251g de NaN₃ e diluir para 50 mL com água deionizada. **Obs.:** Usar luvas e máscara
- ✓ **Vanadato 10 mM** (50 mL) - Pesar 0,0610g de ortovanadato de sódio, diluir em 40 mL com água deionizada e corrigir o pH para 7,5 a 8,0 com tampão.
- ✓ **NaF 0,1M** (50 mL) - Pesar 0,2099g de NaF e diluir em 50 mL com água deionizada.
- ✓ **PPi 0,1 M** (50 mL) - Pesar 2,2303g de pirofosfato de sódio e diluir em 50 mL com água deionizada.
- ✓ **BTP 0,5M** (25 mL) - Pesar 3,5293g de BTP e diluir em 25 mL com água deionizada. Usado para correção de pH.
- ✓ **Imidazol 1M** (25 mL) - Pesar 1,702g de imidazol e diluir em 25 mL com água deionizada. Usado para correção de pH.
- ✓ **Ácido ascórbico 10% p/v** (25 mL) - Pesar 2,5 g e diluir em 25 mL com água deionizada. Obs.: preparar 1 dia antes e armazenar em frasco escuro coberto com papel alumínio.
- ✓ **ATP 40 mM** – pesar 0,2421 g e diluir com água deionizada para 10 mL. Corrigir o pH com BTP para o valor desejado e armazenar em frizer -20°C.

PREPARO DOS TAMPÕES PARA ATIVIDADE

PM-H⁺-ATPases

- ✓ **MOPS-BTP 0,5M pH 6,5** (50 mL) – diluir 5,2325g de MOPS em 40 mL de água deionizada e corrigir o pH para 6,5 com BTP 1M. Completar o volume para 50 mL. Armazenar em geladeira.

V-H⁺-ATPase

- ✓ **HEPES-BTP 0,5M pH 7,5** (50 mL) – adicionar 25 mL de HEPES 1M (solução adquirida pronta), adicionar água até 40 mL e corrigir o pH para 7,5 com BTP 1M. Completar o volume para 50 mL. Armazenar em geladeira.

H⁺-PPases

- ✓ **MOPS-Imidazol 0,5M pH 7,2** (50 mL) – diluir 5,2325g de MOPS em 40 mL de água deionizada e corrigir o pH para 7,2 com Imidazol 1M. Completar o volume para 50 mL. Armazenar em geladeira.

MEIO PARA INTERROPER A REAÇÃO DE HIDRÓLISE

Preparo de 500 mL

- ✓ Em Becker de 0,5 L adicionar 10 mL de H₂SO₄ conc. (2%), em seguida adicionar por volta de 300 mL de água deionizada e 25 g de SDS (5% p/v), dissolver o SDS, e logo após adicionar 3,5 g de (NH₄)₂MoO₄ (0,7% p/v). Transferir a solução para balão de 500 mL, aferir o volume com água deionizada e armazenar a solução em geladeira.

Obs.: O SDS deve ser pesado usando-se marcara

MEIO PARA EVITAR DESENVOLVIMENTO DE COLORAÇÃO ADICIONAL APÓS PERÍODO DE ATIVIDADE

Preparar 500 mL

- ✓ Em Becker de 0,5 L adicionar 20 g de Citrato de Sódio (4%), em seguida adicionar por volta de 300 mL de água deionizada, dissolver o citrato de sódio, e logo após adicionar 10 mL de Acido Acético Glacial. Transferir a solução para balão de 500 mL, aferir o volume com água deionizada e armazenar a solução em geladeira.

Obs.: Pipetar o ácido acético glacial em capela de exaustão.

PREPARO DO PADRÃO FOSFATO

Estoque de 1mM de KH_2PO_4 – pesar 0,1361g e diluir em 1L de H_2O deionizada.

Tubos	$[\text{PO}_4^-] \mu\text{M}$	Vol. Estoque 1mM (μL)	H_2O (μL)	Conc. Final PO_4^- (μM)
1	0	0	500	0
2	25	12,5	487,5	4,167
3	50	25	475	8,333
4	100	50	450	16,667
5	150	75	425	25
6	200	100	400	33,333
7	250	125	375	41,667
8	300	150	350	50
9	400	200	300	66,667
10	500	250	250	83,333

Obs.: A concentração final de PO_4^- foi obtida dividindo o valor inicial por 6, pois após a adição de 1 mL do meio de parada + 50 uL de ácido ascórbico + 1,45 mL do meio contendo citrato de sódio a solução inicial é diluída em 6 vezes.

SOLUÇÕES PARA ATIVIDADE DAS PROTEÍNAS

P-H⁺-ATPase – 10 mL	V-H⁺-ATPase – 10 mL	V-H⁺-PPase – 10 mL
✓ 0,6 mL de MOPS-BTP 0,5M pH 6,5	✓ 0,6 mL de HEPES-BTP 0,5M pH 7,5	✓ 0,6 mL de MOPS – Imidazol 0,5 M
✓ 0,5 mL de MgSO ₄ 0,1M	✓ 0,5 mL de MgSO ₄ 0,1M	pH 7,2
✓ 0,5 mL de KCl 1M	✓ 0,5 mL de KCl 1M	✓ 0,5 mL de MgSO ₄ 0,1M
✓ 0,10 mL de Na ₂ MoO ₄ 0,1M	✓ 0,1 mL de Na ₂ MoO ₄ 0,1M	✓ 0,2 mL de Triton X-100 1%
✓ 0,20 mL de Triton X-100 1%	✓ 0,2 mL de Triton X-100 1%	✓ 0,1 mL de NaN ₃ 0,1M
✓ 0,5 mL de KNO ₃ 1M	✓ 0,2 mL de ortovanadato 10mM	✓ 0,1 mL de PPi 0,1M
✓ 0,10 mL de NaN ₃ 0,1M	✓ 0,1 mL de NaN ₃ 0,1M	
✓ 1,25 mL de ATP-BTP 40 mM	✓ 1,25 mL de ATP-BTP 40 mM	
Preparar com e sem 0,2mM vanadato (0,2mL de vanadato 10mM)	Preparar com e sem 100nM bafilomicina ou 50mM de KNO ₃ (0,5mL de KNO ₃ 1M).	Preparar com e sem 100mM KCl (1mL de KCl 1M) e com 2,5mM NaF (0,25 mL de NaF 0,1M)

- ❖ Fazer os brancos: sem ATP ou PPi e com as proteínas e com o ATP ou PPi sem as proteínas. No primeiro caso quantifica-se o fosfato naturalmente presente na amostra ou hidrólise residual de substrato, e no segundo caso a hidrólise do substrato no período do ensaio.
- ❖ Incubar durante 30 min à 30°C.
- ❖ Adicionar 1 mL do meio de parada (2% v/v de H₂SO₄, 5% p/v de SDS, 0,7% p/v de (NH₄)₂MoO₄)
- ❖ Adicionar 50 µL de ac. Ascórbico 10% p/v e agitar.
- ❖ Esperar 10 min e adicionar 1,45 mL do meio contendo citrato (4% de citrato de sódio e 2% ácido acético glacial).
- ❖ Esperar 30 min e ler em absorvância de 820 nm.

- ✓ O branco ou controle geralmente é um meio de reação contendo os inibidores específicos para cada proteína. Vanadato para as P-H⁺-ATPases e bafilomicina ou concanamicina para as V-H⁺-ATPases.
- ✓ A atividade para as H⁺-PPases deve ser dividida por dois, visto a hidrólise de um PPi gerar dois Pi.
- ✓ Quando se usa NO₃⁻ no meio de reação como inibidor das V-H⁺-ATPases costuma-se obter leituras altas. Isto se deve a uma aceleração da reação de coloração provocada pelo nitrato. Dessa forma é necessário fazer um branco-nitrato, ou seja, um meio contendo todos os componentes básicos mais o nitrato, porém sem as proteínas. Subtraí-se a leitura obtida neste meio pelo que contém o nitrato e as proteínas e assume o resultado obtido como branco da reação.
- ✓ Quando se separam as membranas por gradiente de sacarose, apenas uma pequena fração está na orientação inversa “inside out”, o que permite um baixo acesso do ATP ao sítio catalítico da enzima. O Triton X-100 tem a habilidade de criar orifícios nas vesículas, portanto a atividade das P-ATPases é bastante estimulada pela sua adição.