

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

TESE

**Expressão de Genes Relacionados à Absorção e
Metabolismo de Nitrogênio em Arroz sob Alto e
Baixo Suprimento de Nitrato**

Carlos Alberto Bucher

2011



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

**EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À ABSORÇÃO E
METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM ARROZ SOB ALTO E BAIXO
SUPRIMENTO DE NITRATO**

CARLOS ALBERTO BUCHER

Sob a Orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação dos Professores
Sonia Regina de Souza e
Leandro Azevedo Santos

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

633.187

B919e

T

Bucher, Carlos Alberto, 1981-

Expressão de genes relacionados à absorção e metabolismo de nitrogênio em arroz sob alto e baixo suprimento de nitrato / Carlos Alberto Bucher – 2011.
83 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.

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

Bibliografia: f. 67-83.

1. Arroz - Variedades – Teses. 2. Nitrogênio - Fixação – Teses. 3. Nitrogênio na agricultura - Teses. I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título.

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

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

CARLOS ALBERTO BUCHER

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

TESE APROVADA EM 23/02/2011

Manlio Silvestre Fernandes. PhD. UFRRJ
(Orientador)

Marcio Alves Ferreira. Dr. UFRJ

Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior. Dr. UEMA

Leonardo de Oliveira Médici. Dr. UFRRJ

Everaldo Zonta. Dr. UFRRJ

DEDICATÓRIA

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

A minha Mãe Nair Krause Bucher e meu Irmão Carlos Henrique Bucher que sempre me deram forças e torceram por mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

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

A minha querida Natalia Zatorre, pelo seu amor, apoio, carinho e compreensão em todos os momentos de minha vida;

Ao Prof. Manlio Silvestre Fernandes pela orientação e ensinamentos sobre pesquisa científica, do qual tenho orgulho de ser orientado;

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

A Elvia Mariam Lis Martinez Stark pelo incentivo e valiosos conselhos;

Ao Professores Leandro Azevedo dos Santos e Marco André, pela amizade e ajuda nos trabalhos.

A todos os colegas de laboratório Osmário, Marcus Vinicius, Rafaela Eloi, Vinicius Miranda, Cassia Coelho, Renata Ribeiro, Ana Maria. Obrigado pela amizade, convívio, companheirismo, ajuda nas coletas, pelas boas risadas, pelas palavras de incentivo, vocês contribuíram muito;

Aos bolsistas de iniciação científica Rafael, Leandro Ferreira, Luis Claudio pelo apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais.

Aos amigos Elio Barbieri, Roberta, Anita Bonita, Luciene pela ajuda, amizade, pelas boas risadas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Solos, pela cordialidade, presteza e amizade, sempre prontos a nos atender.

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

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento.

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

BIOGRAFIA

Carlos Alberto Bucher nasceu na cidade de Itaguaçu – ES, em 11 de maio de 1981. Concluiu o ensino fundamental na Escola Eurico Salles, formou em Técnico em Agropecuária na Escola Agrotécnica Federal de Colatina – ES 1998. Iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 1999, diplomando-se em 2005. Durante a graduação foi bolsista de Pré-iniciação Científica e Iniciação Científica por 5 anos no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Solos estudando absorção e metabolismo de nitrogênio em arroz sob orientação do Prof. Manlio Silvestre Fernandes. Em março de 2007 recebeu o título de Mestre em Agronomia – Ciências do Solo, pela UFRRJ do Solo sob a orientação da Prof. Manlio Silvestre Fernandes. No mesmo ano ingressou no Doutorado em Agronomia – Ciências do Solo pela UFRRJ do Solo sob a orientação da Prof. Manlio Silvestre Fernandes. Foi bolsista do CNPq durante os dois primeiros anos e bolsista nota 10 da FAPERJ durante o restante do curso. Foi professor substituto da disciplina de Fisiologia Vegetal na UFRRJ nos anos de 2010 e 2011.

RESUMO

BUCHER, Carlos Alberto. **Expressão de genes relacionados à absorção e metabolismo de nitrogênio em arroz sob alto e baixo suprimento de nitrato**. 2011. 83f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O nitrogênio é um dos elementos minerais que mais limita o desenvolvimento das plantas. Assim, aumentar a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) é um fator essencial para uma agricultura sustentável, levando a um aumento da produção de alimentos com menor uso de insumos e menos impactos ao ambiente. A EUN envolve a eficiência de absorção e acúmulo e a eficiência de utilização de N para produção. Compreender os mecanismos envolvidos nesses processos e como eles são controlados é fundamental para a melhoria da EUN nas plantas cultivadas. Para isso, é essencial entender a resposta e comportamento das plantas a diferentes regimes de N, principalmente à limitação de N. O uso de plantas ou variedades com diferenças na EUN é outro fator importante para verificar os principais mecanismos envolvidos. Este trabalho teve por objetivo desse trabalho foi verificar o metabolismo e a expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de nitrogênio nas variedades de arroz Piauí e IAC-47 sob diferentes condições de disponibilidade desse nutriente. O metabolismo de N foi avaliado através da quantificação das frações nitrogenadas no tecido e atividade enzimática, a expressão de genes que codificam para transportadores de N de alta e baixa afinidade e enzimas de assimilação de N. Foram realizados dois experimentos: o primeiro para verificar o comportamento das plantas quando cultivadas sob alto e baixo suprimento de N; e o segundo, para verificar as repostas ao ressuprimento de N. O acúmulo de massa foi maior na variedade IAC-47 em todos os tratamentos. Quando as plantas foram cultivadas por um longo período sob baixo suprimento de N foi observado maior teor de nitrato (NO_3^-) no tecido da variedade Piauí, adaptada a condições de baixa fertilidade, assim como uma alta atividade da nitrato redutase e glutamina sintetase nas raízes dessas plantas. Sob alto suprimento de NO_3^- , por um longo período, a variedade Piauí apresentou maiores teores de NO_3^- nas bainhas e raízes, mas não foram observadas diferenças na atividade de enzimas. A expressão dos transportadores de nitrato na variedade Piauí foi mais elevada nas raízes das plantas sob baixo suprimento de NO_3^- quando comparado as plantas sob alto suprimento de N. Na variedade IAC-47 a expressão dos transportadores de NO_3^- teve comportamento oposto ao observado para a Piauí. Quando as plantas receberam NO_3^- , após um período de 72 horas sem N, houve um rápido aumento, após 6 horas do ressuprimento, na expressão do gene que codifica para o transportador de NO_3^- de alta afinidade *OsNRT2.1* e glutamina sintetase plastidial (GS2) nas raízes da variedade Piauí, e 24 horas após o ressuprimento a expressão foi maior na variedade IAC-47. A eficiência da variedade Piauí está relacionada ao controle diferenciado dos mecanismos de absorção e assimilação de N, que permite a maior expressão dos transportadores de nitrato de alta afinidade em tecido com altos teores de N solúvel, alto status de N, indicando que o controle do sistema de absorção de N pode ser essencial para a eficiência no uso de nitrogênio.

Palavras - chave: Eficiência de uso de N. Expressão gênica. Variedades locais.

ABSTRACT

BUCHER, Carlos Alberto. **Expression of genes related to nitrogen uptake and assimilation in rice plants under high and low nitrate supply**. 2011. 83p. Thesis (Doctor Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Nitrogen is one of the nutrient elements most limiting for plant growth. Thus, increasing plant nitrogen usage efficiency (NUE) is an essential factor for sustainable agriculture, leading to an increased food production with less fertilizer input and less environment impact. NUE in plant involves the uptake and accumulation efficiency, and N use efficiency for grain production. Understanding the mechanisms regulating these processes is crucial for the improvement of NUE in crops. Therefore, is essential to comprehend plants response to different N regimes, mainly N limitation. The usage of plants or varieties with differences in nutrient use efficiency is another important factor to determine the main mechanisms involved in these processes. The objectives of this study were to evaluate N metabolism and expression of genes involved in N uptake and assimilation of two rice varieties (Piauí and IAC-47), under different N supply conditions. The N metabolism was evaluated by quantification of nitrogen fractions in plant tissue and enzymatic activity, expression of genes that code for high and low affinity N transporters, and N assimilation enzymes. Two experiments were conducted: the first, to investigate the plants behavior when grown under high and low N supply; and the second to verify plants response to NO_3^- resupply. The IAC-47 variety showed greatest mass accumulation in all treatments. When plants were grown for a long period under low N supply it was observed a higher nitrate (NO_3^-) content in the tissue of Piauí variety, which is adapted to low fertility conditions, as well as a high activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in the roots of these plants. When under high NO_3^- supply for a long period, Piauí variety had higher NO_3^- concentrations in roots and sheaths, but no differences were observed in enzymes activity. The nitrate transporters expression was higher in roots of Piauí plants under low supply of NO_3^- when compared to Piauí plants under high N supply. Nitrate transporters expression in roots of IAC-47 plants showed a pattern opposite to the one observed for Piauí plants. When plants were resupplied with NO_3^- , after a 72 hours period without N, there was a rapid increase, after 6 hours of resupply, in the expression of high affinity nitrate transporters genes (OsNRT2.1) and the plastidial glutamine synthetase (GS2) in the Piauí variety roots, and a higher expression of these in IAC-47 roots after a 24 hours of N resupply. The efficiency of Piauí variety is related to the differentiated control of N absorption and assimilation mechanisms, which allow bigger expression of high affinity nitrate transporters in tissue with high levels of soluble N, high N status, indicating that the control of nitrogen uptake system may be essential for the nitrogen usage efficient.

Key words: Nitrogen usage efficiency. Gene expression. Local variety plants.

LISTA DE SÍMBOLOS

ATP	Adenosina Trifosfato (<u>A</u> denosine <u>T</u> riphosphate)
BSA	Albumina de Soro Bovino (<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine)
DAG	<u>D</u> ias <u>A</u> pós a <u>G</u> erminação
DTT	<u>D</u> itiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetracético
Fd	<u>F</u> erredoxina
GS	<u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (<u>H</u> igh <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (<u>L</u> ow <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Reduzida
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NIR	<u>N</u> itrito <u>R</u> edutase
NR	<u>N</u> itrato <u>R</u> edutase
NRT1	Família de Genes para os Transportadores de NO ₃ ⁻ de Baixa Afinidade
NRT2	Família de Genes para os Transportadores de NO ₃ ⁻ de Alta Afinidade
OsGS1.1	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>1.1</u>
OsGS1.2	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>1.2</u>
OsGS2	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>2</u>
OsGS2c	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>G</u> lutamina <u>S</u> intetase <u>2c</u>
OsAct11	<u>O</u> ryza <u>s</u> ativa <u>A</u> ctina 11
PVP	Polivinilpirrolidona
RNAm	Ácido Ribonucléico Mensageiro (<u>R</u> ibonucleic <u>a</u> cid <u>m</u> essenger)
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sinalização por nitrato sob alta e baixa disponibilidade de NO_3^- na solução externa, e indução do transportador NTR2.1 mediado pelo transportador CHL1 (NRT1.1) (Adaptado de VERT & CHORY, 2009). Linhas com uma seta indicam indução, linhas com traço indicam repressão. 10
- Figura 2.** Esquema representativo do Experimento I utilizando as variedades de arroz Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva e submetidas aos 15 dias após a germinação a baixo ($0,15\text{mmol L}^{-1}$) e alto (5mmol L^{-1}) suprimento de N-NO_3^- . Após 10 dias nestes tratamentos as plantas tiveram as soluções trocadas para 5mmol L^{-1} e $0,15\text{mmol L}^{-1}$ de N-NO_3^- , onde permaneceram, respectivamente, por duas horas e 24 horas. 17
- Figura 3.** Esquema representativo do Experimento II utilizando as variedades de arroz Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva e submetidas aos 20 dias após a germinação a uma solução sem N. Após 72 horas em solução sem N, as plantas foram separadas em três grupos, um grupo continuou em solução sem N e os outros dois receberam o ressurgimento de N a 5mmol L^{-1} e $0,15\text{mmol L}^{-1}$ de N-NO_3^- , as coletas foram realizadas 6 e 24 horas após o ressurgimento. 22
- Figura 4.** Massa seca de folhas, raízes e bainhas, e massa seca total (B) das variedades de arroz Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo $0,15$ e $5,0\text{mmol de NO}_3^- .\text{L}^{-1}$. As plantas cultivadas em $0,15$ e $5,0\text{mmol de NO}_3^- .\text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo $5\text{mmol de NO}_3^- .\text{L}^{-1}$ por duas horas ($0,15/5$) e $0,15\text{mmol de NO}_3^- .\text{L}^{-1}$ por 24 horas ($5/0,15$) respectivamente. 23
- Figura 5.** Teores de NO_3^- em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo $0,15$ e $5,0\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- . Dois grupos de plantas cultivadas em $0,15$ e $5,0\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas ($0,15/5$) e $0,15\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- por 24 horas ($5/0,15$) respectivamente. 26
- Figura 6.** Teores de N-NH_4^+ em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo $0,15$ e $5,0\text{mmol de NO}_3^- .\text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em $0,15$ e $5,0\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas ($0,15/5$) e $0,15\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- por 24 horas ($5/0,15$) respectivamente. 28
- Figura 7.** Teores de N-amino em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo $0,15$ e $5,0\text{mmol de NO}_3^- .\text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em $0,15$ e $5,0\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas ($0,15/5$) e $0,15\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- por 24 horas ($5/0,15$) respectivamente. 30
- Figura 8.** Teores de açúcares solúveis em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo $0,15$ e $5,0\text{mmol de NO}_3^- .\text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em $0,15$ e $5,0\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas ($0,15/5$) e $0,15\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- por 24 horas ($5/0,15$) respectivamente. 31
- Figura 9.** Atividade da nitrato redutase em plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo $0,15$ e $5,0\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- . Dois grupos de plantas cultivadas em $0,15$ e $5,0\text{mmol L}^{-1}$ de NO_3^- foram transferidas para soluções

contendo 5 mmol L ⁻¹ de NO ₃ ⁻ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.	33
Figura 10. Atividade de Glutamina Sintetase em plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15-5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5-0,15) respectivamente.	35
Figura 11. Expressão relativa dos genes que codificam para Glutamina Sintetase, isoformas GS1 (OsGS1.1; OsGS1.2) GS2 (OsGS2) e OsGSI, em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.	37
Figura 12. Expressão relativa dos genes que codificam para NADH-GOGAT, isoformas GLT1 e GLT2 em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.	39
Figura 13. Atividade de P-H ⁺ -ATPase em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.	40
Figura 14. Expressão relativa dos genes que codificam para duas isoformas de P-H ⁺ -ATPase (OsOSA2 e OsOSA7) em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.	42
Figura 15. Expressão relativa de transportadores de nitrato de alta afinidade (NTR2) em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15-5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5-0,15) respectivamente.	43
Figura 16. Expressão relativa de genes que codificam para proteínas NAR2.1 e NAR2.2 em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15-5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente. ...	45
Figura 17. Expressão relativa de transportadores de nitrato de alta afinidade (OsNTR2) em folhas de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por duas horas (0,15-5) e 0,15 mmol de NO ₃ ⁻ .L ⁻¹ por 24 horas (5-0,15) respectivamente.	47

- Figura 18.** Expressão relativa de transportadores de nitrato de baixa afinidade (OsNTR1) em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente. 48
- Figura 19.** Expressão relativa de transportadores de nitrato de baixa afinidade (OsNTR1) em folhas de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ (por duas horas) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \cdot \text{L}^{-1}$ (por 24 horas) respectivamente..... 49
- Figura 20.** Teores de N-NO_3^- em folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e após com 0,15 e 5 mmol L^{-1} de NO_3^- 52
- Figura 21.** Teores de amino ácidos livres em folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e após com 0,15 e 5 mmol L^{-1} de NO_3^- 53
- Figura 22.** Teores de açúcares solúveis em folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e após com 0,15 e 5 mmol L^{-1} de NO_3^- 54
- Figura 23.** Atividade da Glutamina Sintetase em folhas e raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio. 55
- Figura 24.** Expressão relativa dos genes que codificam para isoformas de Glutamina Sintetase citosólica de arroz, variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio. 57
- Figura 25.** Expressão relativa dos genes que codificam para isoformas de Glutamina Sintetase plástica de arroz, variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio. 59
- Figura 26.** Expressão relativa dos genes que codificam para os transportadores de nitrato de alta afinidade, em raízes de plantas de arroz, variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio..... 61
- Figura 27** Expressão relativa dos genes que codificam para que codificam para proteínas NAR, em raízes de plantas de arroz variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio. 62
- Figura 28.** Expressão relativa dos genes que codificam para que codificam para os transportadores de nitrato de baixa afinidade (NRT1), em raízes de plantas de arroz variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio. 63

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1:** Características das principais técnicas utilizadas em estudos de expressão gênica em larga escala..... 12
- Tabela 2:** Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de PCR em tempo real para os genes de três isoformas de Glutamina sintetase citossólica (GS1.1 e 1.2; GSI), duas isoformas de Glutamina sintetase plastidial (GS2 e GS2c), duas isoformas de Glutamato sintase (NADH-GOGAT 1 e 2), quatro transportadores de nitrato de alta afinidade (OsNRT2.1 a 2.4), quatro transportadores de nitrato de baixa afinidade (OsNRT1.1 a 1.4), duas isoformas de proteína reguladora NAR (OsNAR2.1 e 2.2), duas isoformas de bombas de prótons (OsOSA2 e 7) e gene controle da Actina (OsAct11) de arroz e números de acesso no banco de dados do NCBI..... 20
- Tabela 3.** Relação Raiz:Parte Aérea, com base no peso fresco, de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC 47 submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- na solução nutritiva..... 25
- Tabela 4.** Massa fresca de plantas de arroz após ressuprimento com N-NO_3^- (0,15 e 5 mmol L^{-1}) por 6 e 24 horas, após permanecer por 72 h em solução sem N..... 50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1	Absorção de Nitrato.....	4
2.2	Assimilação de Nitrogênio	6
2.3	Estudos de Eficiência de Uso de Nitrogênio.	7
2.4	Sinalização Envolvida nas Respostas ao Nitrato.....	9
2.5	Avaliação da Expressão Gênica	11
2.6	PCR em Tempo Real	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Experimento I: Comportamento das Variedades de Arroz IAC-47 (Melhorada) e Piauí (Local) Cultivadas com Alto e Baixo Suprimento de N-NO ₃ ⁻	16
3.3	Atividade da Nitrato Redutase.....	17
3.4	Atividade da Glutamina Sintetase	17
3.5	Isolamento de Vesículas de Plasmalema e Atividade das PM-H ⁺ -ATPases	18
3.6	Avaliação da Expressão Gênica	19
3.6.1	Extração de RNA total.....	19
3.6.2	Quantificação do RNA e síntese de cDNA de fita simples	19
3.6.3	PCR em tempo real.....	19
3.7	Experimento II: Expressão Gênica de Glutamina Sintetase e de Transportadores de Nitrato de Alta e Baixa Afinidade em Resposta ao Ressuprimento de N em Variedades de Arroz Piauí e IAC-47.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Comportamento das Variedades de Arroz IAC-47 (Melhorada) e Piauí (Local) Cultivadas com Alto e Baixo Suprimento de N-NO ₃ ⁻ (Experimento I)	23
4.2	Expressão Gênica de Glutamina Sintetase e Transportadores de Nitrato em Resposta ao Ressuprimento de Nitrato na Solução Nutritiva (Experimento II)	50
5	CONCLUSÕES.....	64
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes essenciais de maior demanda metabólica e que mais limita a produtividade das culturas (LEA & AZEVEDO, 2006). Assim, o cultivo de plantas com o objetivo de se obter alta produção de grãos ou ainda produzir grãos ricos em proteínas requer grandes quantidades de fertilizantes nitrogenados. O uso de fertilizantes nitrogenados pelas plantas é geralmente ineficiente, sendo 50 a 70% do N aplicado perdido do sistema solo-planta (PEOPLES et al., 1995). Como consequência, nas últimas décadas o incremento em duas vezes na produção mundial de alimentos agrícolas foi alcançado com o incremento em 20 vezes na quantidade de fertilizantes nitrogenados (SHRAWAT & GOOD, 2008). O aumento no uso de fertilizantes de nitrogenados resulta em vários danos ambientais, como a contaminação do lençol freático e rios por nitrato (DAVIES & SYLVESTER-BRADLEY, 1995) e emissão de óxido nítrico (BOUWMAN et al., 2002). Dessa forma, a eficiência no uso de fertilizantes nitrogenados é crucial para sustentar a produção de agrícola.

Assim, a necessidade de reduzir os problemas causados por fertilizantes nitrogenados tem fortalecido a necessidade de melhorar a eficiência no uso de nitrogênio (EUN) nas culturas agrícolas. Isso torna necessário o desenvolvimento de cultivares que capturam e assimilam o N de maneira mais eficiente pode reduzir a necessidade de fertilizantes nitrogenados ou aumentar a produção sem a necessidade de aumentar a aplicação de fertilizantes, sem afetar o meio ambiente (SHRAWAT & GOOD, 2008).

O nitrogênio é um dos nutrientes responsáveis pelos altos custos dos insumos agrícolas e tem tido muita atenção nas pesquisas buscando aumento de produção. A redução do uso de fertilizantes nitrogenados pode ser alcançada não só através de técnicas eficientes de cultivo, mas também pelo uso de variedades que tenham uma alta eficiência no uso de nitrogênio. O desenvolvimento de tais variedades é favorecido por um melhor conhecimento das bases fisiológicas e genéticas da eficiência no uso de nitrogênio (HIREL et al., 2001). Uma abordagem importante é entender a resposta de plantas a diferentes regimes de N, especialmente a condições de disponibilidade limitante, e estudar a nível filológico e molecular as plantas que apresentam melhor desenvolvimento nessas condições (KANT et al., 2011).

Entre os cereais consumidos pelo homem, principalmente pela população de baixa renda, o arroz destaca-se entre os mais importantes, sendo necessário, além da busca de altas produções, o desenvolvimento de variedades com grãos de alto valor nutritivo. Nesse contexto, a importância do nitrogênio na cultura de arroz é indiscutível.

A qualidade dos grãos de arroz está sob controle genético e pode sofrer efeito das condições ambientais. Comparado a outras culturas, o arroz mostra-se como uma excelente fonte de proteína, possuindo oito aminoácidos essenciais ao homem (KANNAN et al.; 2001). Além da sua importância econômica, estudos com arroz evoluíram de tal maneira que esta espécie foi indicada como a planta modelo em pesquisas genômicas, representando 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 cereais: aveia, milho, sorgo, trigo e cevada (SANDHU & GILL, 2002; BENNETZEN & MA, 2003).

Em solos aeróbicos, a maior parte do nitrogênio está na forma de nitrato. Não apenas o nitrato, mas também os produtos de sua redução como o óxido nítrico e glutamato podem agir como nutriente e sinal, alterando o metabolismo das plantas (CRAWFORD, 1995; SCHEIBLE, et al. 1997). Desta forma, em resposta à nutrição nítrica, um grande número de genes pode ter sua expressão aumentada ou reduzida. É possível que estes genes se dividam em grupos cuja expressão é controlada por fatores de transcrição.

Um dos aspectos da resposta ao estresse se dá transcricionalmente, o que envolve a alteração da expressão gênica (TESTER et al., 2003). Os padrões de expressão de genes em arroz sob condições de estresse salino e estresse hídrico, em uma mesma parte da planta mostra a existência de genes expressos da mesma forma sob ambas as situações, mas quando se compara diferentes partes das plantas verifica-se que alguns genes são específicos (ZHOU et al., 2007), tornando necessário o estudo de cada parte separadamente.

Para integrar as ações da sinalização do nitrogênio, as plantas utilizam varias rotas de sinalização que atuam na comunicação entre as condições externas e internas de N. Uma rota depende do próprio nitrato, no entanto, há outras, como uma que utiliza a citocinina (SAKAKIBARA et al., 2006), um hormônio vegetal, como um mensageiro. Trabalhos recentes de expressão gênica têm mostrado que sinais específicos do nitrato regulam uma grande variedade de processos metabólicos incluindo o metabolismo de N, C e a síntese de citocinina (SAKAKIBARA et al., 2006). A redução da expressão de uma isoforma de citocinina oxidase em panículas de arroz resultou em aumento na produção de grãos (ASHIKARI et al., 2005) e a expressão de genes envolvidos na síntese de citocinina pode ser regulada por nitrato (SAKAMOTO et al., 2006). Uma notável característica do controle dependente de nitrato é que um ou poucos genes de cada família gênica responde ao nitrato, sugerindo que as plantas possuem um grupo especializado de genes para o uso de nitrato e que eles são coordenados de acordo com a absorção e redução do nitrato (SAKAKIBARA et al., 2006). Além de fitohormônios, moléculas como o glutamato, um aminoácido comumente encontrado na seiva do floema e resultante da assimilação do N, podem atuar como uma molécula de sinalização a longa distância, sinalizando o balanço de carbono e nitrogênio entre a parte aérea e as raízes e, sob certas concentrações na solução externa, pode induzir ao crescimento radicular, apesar do mecanismo ainda não ser bem caracterizado (FORDE & LEA, 2007).

Duas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a eficiência de uso de nutrientes em plantas cultivadas (GOOD et al., 2004). A primeira envolve tanto o melhoramento convencional como a seleção assistida por marcadores moleculares, numa tentativa de identificar os genes envolvidos. A segunda usa o desenvolvimento plantas geneticamente modificadas para expressar genes específicos, que controlem uma ou mais rotas metabólicas, de modo que aumente a eficiência de uso de nutrientes. Estudos envolvendo marcadores moleculares têm identificado e analisado QTLs (quantitative trait loci – loci para característica quantitativa) relacionados à eficiência de uso de N em milho (HIREL et al., 2001), trigo (DISTELFELD et al., 2006; AN, et al., 2006; GREGERSEN et al., 2007), arroz (OBARA et al. 2002, LIAN et al., 2005; ISHIMARU et al., 2005; CHO, et al., 2007), *Arabidopsis* (HARADA et al., 2004). Em estudos com plantas transgênicas têm sido verificado a contribuição de enzimas chave no metabolismo de N (TABUCHI et al., 2005; MARTIN et al., 2006) e o envolvimento de genes que controlam mais de uma via metabólica, como os fatores de transcrição (YANAGISAWA, 2004; UAUY et al., 2006).

Em trabalhos anteriores observou-se que variedades locais de arroz de sequeiro, oriundas do estado do Maranhão (trópico húmido), apresentavam-se tolerantes a estresses como: excesso de Al^{3+} em solução (MENDONÇA, 1991), períodos de escassez de nitrogênio (SANTOS et al., 2007; RODRIGUES et al., 2004) e algumas dessas variedades com alta eficiência de uso de nitrogênio e acúmulo de proteína no grão (ARAÚJO et al., 2003; SOUZA et al., 1998; FERRAZ Jr. et al. 1997) tornando-se assim um repositório de variabilidade genética que pode ser utilizado no melhoramento.

A hipótese deste estudo que essas variedades locais estudadas, em que deve ser destacada a Piauí, para a qual os resultados obtidos indicam que ao longo de muitos anos de cultivo sob condições ambientais adversas, desenvolveram mecanismos bioquímicos e moleculares direcionados para a manutenção da homeostase de processos metabólicos que

levam a absorção e assimilação diferenciada de N, evitando variações extremas do metabolismo, o que se reflete em nível aparentemente elevado de resiliência em relação aos efeitos das variações bruscas do ambiente tropical, e lhes permite suportar situações de estresse, como a baixa disponibilidade de nitrogênio, em comparação com uma variedade melhorada como a IAC-47, que foi desenvolvida e selecionada para o uso de insumos, resultando em baixa eficiência de uso de nitrogênio.

Essa resiliência antes demonstrada sob os aspectos bioquímicos é agora demonstrada neste e em outros trabalhos, sob os aspectos moleculares, principalmente no que se refere a expressão de genes que codificam proteínas responsáveis pela absorção e assimilação de N. O objetivo desse trabalho foi verificar o metabolismo e a expressão de genes envolvidos na absorção e assimilação de nitrogênio nas variedades de arroz Piauí e IAC-47 sob diferentes condições de disponibilidade desse nutriente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Absorção de Nitrato

Em plantas de arroz, aproximadamente 90% de todo N acumulado é absorvido antes do início da fase reprodutiva (antese), e aproximadamente 65% deste N é redistribuído para os grãos (JIANG et al., 2004). Estes mesmos autores verificaram uma alta correlação entre o acúmulo de N antes da antese com a eficiência fisiológica de uso de N.

Em solos bem aerados, o nitrato é a maior fonte de N, e mesmo em arroz inundado a difusão de oxigênio pelas raízes promove o processo de nitrificação em sua rizosfera e, por conseqüência, há a absorção de N-NO₃⁻ mesmo nestas condições, tendo um significativo efeito positivo no desenvolvimento de plantas de arroz (KIRK & KRONZUCKER, 2005).

A absorção de nitrato é realizada por transportadores que são codificados por uma família multigênica. De acordo com sua afinidade pelo substrato (Km), os transportadores de NO₃⁻ são divididos em dois sistemas, denominados: sistema de transporte de baixa afinidade (LATS – “Low Affinity Transport System”) e sistema de transporte de alta afinidade (HATS – “High Affinity Transport System”) (VIDMAR et al., 2000; CERESO et al., 2001; FILLEUR et al., 2001). Os sistemas de transporte (HATS e LATS) são ainda classificados em constitutivos e induzidos de acordo com a resposta ao suprimento de NO₃⁻. O sistema de alta afinidade constitutivo (cHATS) é caracterizado por baixos valores de Km (6-20 µM) e Vmax (0,3-0,82 µmol g h⁻¹) e, os transportadores de alta afinidade induzidos por nitrato apresentam maiores valores de Km (20-100 µM) e Vmax (3-8 µmol g h⁻¹). O sistema de alta afinidade tem maior contribuição na absorção sob baixa concentração de nitrato e atinge a Vmax em concentrações externas de NO₃⁻ entre 250 e 500 µM. O sistema LATS apresenta km entre 2 e 9 mM e apesar de também um processo termodinamicamente ativo não apresenta saturação (GLASS et al., 1992).

Em *Arabidopsis thaliana*, foram isolados sete genes membros da família NRT2 (ORSEL et al., 2002), sugerindo que esta família é composta de vários genes nas plantas superiores. Os mecanismos dos iHATS para absorção de nitrato têm sido revelados por análises funcionais usando mutantes de *A. thaliana*, *atnrt2*, em que o transportador *AtNRT2.1* não funciona e parte do *AtNRT2.2*, mostrando um decréscimo na habilidade de absorver apenas através do iHATS (CERESO et al., 2001; FILLEUR et al., 2001).

Em arroz, ARAKI e HASEGAWA (2006) estudando os genes envolvidos no transporte de nitrato no sistema de alta afinidade encontraram quatro genes da família NRT2 (*OsNRT2.1-2.4*). Estes autores verificaram que o pré-tratamento com amônio afeta a expressão dos *OsNRT2s* nas raízes. Em plântulas sem o pré-tratamento com uma fonte de nitrogênio, transcritos de *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT2.4* foram detectados meia hora após o tratamento com 200 µM de nitrato, enquanto o *OsNRT2.3* já apresentava expressão antes da indução por nitrato. Quando as plântulas foram pré-tratadas com amônio, a indução do *OsNRT2.1* e do *OsNRT2.4* só foi observada duas horas após o fornecimento de nitrato, enquanto os *OsNRT2.2* e *OsNRT2.3* já apresentavam expressão no início da indução.

Através da análise de expressão gênica, utilizando RT-PCR (Transcrição Reversa acoplada a Reação em Cadeia da Polimerase) foi verificado que a família de genes *AtNRT2* podem ser classificados em três categorias, nitrato-induzíveis, nitrato-reprimidos e nitrato-constitutíveis (OKAMOTO et al., 2003). Estes mesmos autores mostram uma clara correlação positiva entre a absorção de nitrato e a quantidade de transcritos de *AtNRT2.1*. Em outro estudo, bloqueio da expressão do *AtNRT2.1* foi suficiente para diminuir drasticamente a contribuição dos sistemas iHATS e cHATS, mostrando que o *AtNRT2.1* é o maior colaborador para os dois sistemas (LI et al., 2007).

Estudos já mostraram que a quantidade de RNAm dos genes de iHATS aumenta rapidamente após fornecimento de nitrato às plantas previamente 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). Esse tipo de indução já foi verificado também para o sistema de baixa afinidade (WANG et al., 2001).

Os transportadores de NO_3^- de alta afinidade são induzidos pela exposição ao NO_3^- ou NO_2^- , porém esse fato nunca foi explicado 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 transportadores têm 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; GLASS et al., 2002; ORSEL et al., 2002).

É necessário também considerar os fatores envolvidos na ativação e/ou regulação dos transportadores NRT2. Estudos demonstram que para haver absorção de NO_3^- via NRT2, são necessárias proteínas específicas que se associam a estes transportadores e só assim os tornam funcionais (ZHOU et al., 2000). Estas proteínas receberam a sigla NAR "Nitrate Assimilation Related" e recentemente foram classificadas como uma nova família de transportadores de nitrato, a NRT3. TONG et al. (2005) encontraram genes parecidos ao NAR2 (NAR2-like) de *C. reinhardtii* em cevada (*HvNAR2.1~2.3*) e mostraram que um dos seus membros, o *HvNAR2.3*, habilitava o *HvNRT2.1* a transportar nitrato. Além disso, em *Arabidopsis*, a proteína NAR2.1 é necessária para o endereçamento do NRT2.1 para a membrana plasmática (WIRTH et al., 2007). Estes resultados indicam que as proteínas NAR2 são essenciais para a absorção de nitrato via HATS.

Em arroz, o nitrato também induz a expressão do *OsNAR2.1* em apenas meia hora após a adição do nitrato acompanhando a expressão do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.4*. Por outro lado, o *OsNAR2.2* já apresentava expressão mesmo em solução sem N (ARAKI e HASEGAWA, 2006). Estes resultados obtidos por ARAKI e HASEGAWA (2006) indicam que o *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* são genes candidatos a programas de melhoramento com o objetivo de aumentar a eficiência de uso de nitrato em arroz.

Além da presença de transportadores específicos, ainda há a necessidade de superar uma barreira termodinâmica para o NO_3^- ser absorvido. O transporte de NO_3^- da rizosfera para o interior celular é termodinamicamente desfavorável em termos de gradiente de potencial elétrico e potencial químico. Isso se deve ao fato de as células apresentarem um interior negativo e o exterior ácido, resultando em uma diferença de potencial, tipicamente na faixa de -150 mV a -200 mV, e a concentração interna de NO_3^- alcançar valores até 50 vezes superiores às do solo. Dessa forma, absorção de nitrato é viabilizada por uma força próton-motriz, proporcionada por bombas eletrogênicas de prótons (H^+ -ATPases), e ocorre via simporte com dois prótons ($\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$), (SONDERGAARD et al., 2004). SANTI et al. (1995) observaram um aumento na quantidade de H^+ -ATPases e alteração dos seus parâmetros cinéticos em plasmalema de raízes de milho quando expostas ao 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^+ -ATPase, 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.

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 thaliana*) e monocotiledôneas (*Oryza sativa*) foi sequenciado, resultando na identificação de, respectivamente, 11 e 10 isoformas das H⁺-ATPases de membrana plasmática (BAXTER et al., 2003). Algumas isoformas exibem padrão de expressão tecido e desenvolvimento específico e apresentam ligeiras diferenças bioquímicas e regulatórias (PALMGREN, 2001).

2.2 Assimilação de Nitrogênio

Após ser absorvido, o NO₃⁻ precisa ser reduzido para então ser assimilado pela planta. A redução do NO₃⁻ é realizada no citossol, pela enzima Nitrito Redutase (NR) produzindo nitrito (NO₂⁻), que entra nos plastídios (cloroplasto na parte aérea) e é reduzido a NH₄⁺ pela Nitrito redutase (NiR). O amônio é então assimilado primariamente via glutamina sintase (GS)/Glutamato sintase (GOGAT), embora rotas alternativas possam ocorrer em condições específicas (DUBOIS et al., 2003). Há dois tipos de GS nas plantas, divididas assim em duas famílias: GS1 (citosólica) e GS2 (plastídica). A GS citosólica (GS₁), ocorrendo no citosol de raízes e células da parte aérea, e a GS plastídica (GS₂), presente nos tecidos fotossintéticos, plastídio de raízes e outros tecidos não fotossintéticos (ISHIYAMA et al., 2004). Embora exista somente um gene que codifica para GS₂, estudos com diversas espécies mostraram que a GS₁ é codificada por uma família multigênica (variando entre três e seis genes) (HIREL e LEA, 2002).

A Glutamina Sintetase catalisa a etapa chave da assimilação do nitrogênio inorgânico que é a incorporação do amônio ao glutamato produzindo a glutamina. O grupamento amino da glutamina é transferido para o α-cetoglutarato pela GOGAT, formando duas moléculas de glutamato. O glutamato é então utilizado como doador de grupamento amino, através de reações de transaminação, para síntese de um grande número metabólicos essenciais como aminoácidos, ácidos nucleicos, açúcares aminados. Assim, a síntese de glutamina pela GS de plantas é considerada base da produtividade das plantas (UNNO et al., 2006). Por esta razão, a importância da GS é comparável com a importância da Ribulose-1,5-Bifosfato Carboxilase/Oxigenase (RUBISCO), a enzima responsável pela assimilação de carbono (BUCHANAN et al., 2000).

OLIVEIRA et al. (2002) superexpressando o gene GS1 sob o controle do promotor CaMV 35S, demonstrou que as plantas transgênicas aumentaram o peso fresco, peso seco e proteína foliar, correlacionados diretamente com os altos níveis de GS nas folhas. Estes resultados sugerem que a superexpressão da GS não resulta consistentemente em aumento na atividade da GS e que o aumento na atividade da GS não está sempre relacionado ao conteúdo de N e acumulação de biomassa.

Estudos têm reportado o aumento nas taxas de crescimento em plantas transgênicas superexpressando GS1, em todos os casos ocorrendo em condições de baixo suprimento de N (OLIVEIRA et al., 2002; FU et al., 2003; HABASH et al., 2001). Quando linhagens transgênicas de trigo superexpressando GS1 de *Phaseolus vulgaris* sob o controle do promotor da subunidade menor da rubisco (rbcS) foram crescidas em potes até a maturidade e sua produtividade analisada, houve aumento na capacidade de acúmulo de nitrogênio nas plantas. Além disso, uma das linhagens mostrou significativo aumento do sistema radicular e grãos com alto conteúdo de nitrogênio (HABASH et al., 2001).

O papel de dois genes que codificam para GS1 citosólica de milho (gln1-3 e gln1-4) foi investigado em detalhes examinando-se o impacto de mutações “knockout” desses genes,

e o efeito da superexpressão do *gln1-3* em milho sobre o rendimento de grãos (MARTIN et al., 2006). Estes autores encontraram um mutante para os dois genes *gln1-3* e *gln1-4* que mostrou reduzido tamanho e número de espigas, sem redução na produção de biomassa na parte aérea na maturidade. Quando o milho foi transformado superexpressando constitutivamente o gene *gln1-3*, houve um aumento significativo no rendimento observado (~30%). Neste mesmo experimento observou-se que não houve diferenças significativas na produção de matéria seca da parte aérea entre as plantas do tipo selvagem e as linhagens transgênicas, sugerindo um impacto específico do *gln1-3* na produção de grãos. As plantas transgênicas de milho superexpressando *gln1-3* produziram maior número de espigas, tanto sob baixo quanto sob alto suprimento de N, quando comparadas com as plantas do tipo selvagem (HIREL et al., 2007).

Em arroz, mutantes knockout na *GS1* obtidos através da inserção de um retrotransposon *Tos17* no exon 8 do gene *OsGS1;1* exibiu uma severa redução no crescimento e enchimento dos grãos, quando cultivados com fertilização nitrogenada convencional. A reintrodução do cDNA do gene *OsGS1;1* sob o controle do seu próprio promotor nos mutantes restabeleceu o fenótipo com crescimento normal (TABUCHI et al., 2005). Mais tarde, estes mesmos autores mostraram que a *GS1;1* é importante para um crescimento e enchimento normal de grãos, e que a *GS1;2* e a *GS1;3* não são capazes de compensar a função da *GS1;1* (TABUCHI et al., 2007).

2.3 Estudos de Eficiência de Uso de Nitrogênio.

Durante a domesticação das plantas houve a seleção de genótipos que sofreram mutações, que perderam genes que atuavam nas espécies ainda não domesticadas, favorecendo a dispersão e propagação da espécie. Teoricamente, a perpetuação da espécie estaria relacionada com um grande número de sementes pequenas e a maior facilidade de dispersão destas. A domesticação das plantas, por exemplo, ocorreu pela seleção daquelas plantas com menor queda de grãos ou frutos, possibilitando assim uma maior colheita. No caso do arroz, para a menor de grãos houve a seleção de plantas que apresentavam mutação em um par de bases localizado na seqüência codante de um gene envolvido no desenvolvimento de tecidos, mais especificamente, um fator de transcrição (LI et al., 2006).

Nas últimas décadas, a combinação de estudos agrônômicos e fisiológicos com a genética quantitativa tem possibilitado o uso de marcadores moleculares para identificar *loci* regulatórios envolvidos na expressão de uma característica quantitativa (QTL). Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos em busca de QTLs responsáveis pela eficiência de uso de nitrogênio e qualidade de grão (CHO, et al., 2007; ISHIMARU, et al., 2005; LIAN, et al., 2005; HIREL, et al., 2001; HU et al., 2004). Estes QTLs são regiões no genoma das plantas onde se localizam genes ou grupos de genes, em que, não necessariamente estejam todos envolvidos na expressão de um fenótipo observado, mas pelo menos um dos genes presentes no QTL, como por exemplo, um fator de transcrição pode controlar a expressão de outro grupo de genes responsáveis pelo fenótipo. O mapeamento mais refinado, e a clonagem dos maiores *loci* identificados nestes estudos podem fornecer, em um futuro próximo, uma maior compreensão dos genes envolvidos nestes processos (KRAPP, et al., 2005; ZHANG et al., 2010). Assim, o estudo dos genes presentes nestes QTLs assim como o perfil de expressão de genes em plantas eficientes ou que apresentem maior desempenho em condições de baixa fertilidade, pode fornecer grandes informações sobre os mecanismos envolvidos na maior eficiência de um grupo de plantas.

Em trigo, foi identificado um QTL que conferia um maior conteúdo de proteínas nos grãos (DISTELFELD et al., 2006). Este *loci* foi encontrado em uma cultivar “antiga”, e comparando esta com cultivares modernas, que apresentam menores teores de proteína,

verificou-se que nas variedades modernas ocorreu a substituição de um par de bases, reduzindo a expressão do gene. Além disso, foi verificada uma alta similaridade entre seqüências do DNA deste QTL com seqüências de DNA no cromossomo 2 de arroz, significando que, nesta região do DNA de arroz pode também haver um QTL envolvido com o teor de proteínas nos grãos. Em continuidade ao trabalho de DISTELFELD et al. (2006), a região do QTL para proteína no grão foi seqüenciada e identificados três genes. Estes três genes foram classificados como fatores de transcrição, da família NAC (refere-se às iniciais dos três primeiros genes descobertos desta família; NAM de petúnia e ATAF1, ATAF2 e CUC2 de Arabidopsis), grupo NAM (No Apical Meristem – um dos genes deste grupo regula a formação do meristema apical), e verificou-se que a deleção de um par de bases em um desses genes resultava em redução dos teores de proteínas e nutrientes nos grãos de trigo (UAUY et al., 2006).

As proteínas NAC, assim como proteínas WRKY compreendem duas grandes famílias de fatores de transcrição em plantas, e estão envolvidos vários processos biológicos sob condições normais e de estresse (FANG et al., 2008; EULGEM & SOMSSICH, 2007); RAMAMOORTHY et al., 2008). Os genes NAC têm sido relacionados à senescência em plantas, assim como os genes da família WRKY, e o aumento da expressão destes genes foi observado durante a senescência em folhas de plantas de trigo (GREGERSEN et al., 2007). A maior capacidade de remobilização de N mostra alta correlação com o teor de proteínas nos grãos (REED et al., 1980; SOUZA et al., 2002; DISTELFELD et al., 2006). A remobilização de N envolve a quebra de proteínas pela ação de proteases e a posterior conversão do N liberado em glutamato e glutamina, que são as principais formas de transporte N em arroz (MAE et al., 1984), dessa forma o controle da atividade das enzimas envolvidas nestes processos podem estar ligados a eficiência do uso de N.

Em plantas super-expressando o gene NAN foi observada maior remobilização de N para os grãos (UAUY et al., 2006) assim como a maior eficiência no uso de N foi verificada em plantas de milho super expressando dois genes que codificam para glutamina sintetase (MARTIN et al., 2006). Nos dois trabalhos citados acima, maiores teores de amino ácidos totais foram observados nos tecidos das plantas. O acúmulo de aminoácidos assim como a maior remobilização de N são algumas das características verificadas em plantas de arroz do estado do Maranhão (variedade Piauí), adaptadas a condições de baixa fertilidade e apresentando alta eficiência no uso de N (SOUZA et al., 1998; SOUZA et al., 1999; SANTOS, 2007; BUCHER, 2007).

A super-expressão de um gene que codifica para um fator de transcrição, Dof 1 de milho, em Arabidopsis, envolvido na ativação de vários genes que codificam enzimas associadas ao metabolismo de ácidos orgânicos, revelou que tanto o crescimento como o conteúdo de nitrogênio aumentaram sob condições de baixa concentração de N no meio externo (YANAGISAWA, 2004). Assim, pode ser observado que a eficiência no uso de N é controlada por mais de uma via metabólica, e que a manipulação da expressão de proteínas reguladoras pode ser uma boa alternativa para aumentar a eficiência de uso de nitrogênio (EUN) nas plantas cultiváveis (HIREL et al., 2007; SANTOS et al., 2011).

Em trigo, estudos de QTL sob alta e baixa disponibilidade de N, têm mostrado que independente da disponibilidade de N, a absorção deste nutriente é controlada por vários genes (AN, et al., 2006). A tolerância a condições de baixa disponibilidade é uma característica altamente desejável em plantas para um sistema sustentável. Foi observado que a tolerância à baixa disponibilidade de N por plântulas de arroz possui uma complexa base genética e requer extensos estudos para sua completa caracterização (LIAN et al., 2005). Em alguns estudos, como é o caso de estudos sobre EUN, que envolve o metabolismo de N, assim como o metabolismo de C, é difícil o uso de marcadores como o QTL, pois os principais fatores que atuam no controle de uma via metabólica podem não ser os elementos presentes

nas regiões dos QTLs, fatores *cis*, e *sim* elementos que controlam a expressão dos genes presentes nos QTL, ou a atividade de enzimas (ZHANG et al., 2010).

2.4 Sinalização Envolvida nas Respostas ao Nitrato

A absorção de nitrato do solo é um processo crítico para as plantas que é controlado por vias de sinalização que envolvem os transportadores de nitrato (NTR) das raízes. Em *Arabidopsis*, NRT1.1 (CHL1), um transportador de dupla afinidade, e o NRT2.1, um transportador de alta-afinidade, estão envolvidos na aquisição de nitrato da solução externa (LIU et al., 2003; LITTLE et al., 2005; REMANS et al., 2006; WANG et al., 2009). Muitos estudos, utilizando plantas geneticamente modificadas têm mostrado os diferentes aspectos da sinalização pelo nitrato, como por exemplo, o desenvolvimento de raízes regulado por nitrato e a expressão gênica regulada por nitrato. Estes dois eventos são alterados em plantas de *Arabidopsis* com mutações no NRT1.1 (*chl1*) ou NRT2.1, sugerindo que eles estão diretamente ou indiretamente envolvidos na sinalização do nitrato.

Na última década foram realizados muitos estudos na busca de genes envolvidos no controle da expressão dos transportadores NRT em resposta ao suprimento de NO_3^- em *Arabidopsis*. Um fato interessante é que, um dos primeiros genes identificados, que exerce controle sobre a expressão do NRT2.1, foi o transportador de baixa afinidade NRT1.1 (MUÑOS et al., 2004). Em plantas de *Arabidopsis* foi demonstrado que este controle ocorre devido a um sinal específico, desencadeado a partir da percepção do NO_3^- pelo NRT1.1 (CHL1), resultando no controle do nível de expressão do NRT2.1 em função da concentração externa de NO_3^- .

Recentemente, um estudo utilizando uma planta mutante (*chl1-9*) incapaz de absorver NO_3^- , demonstrou que a atividade de transporte do NO_3^- (absorção) não é necessária para que ocorra a sinalização através do transportador CHL1, assim, o próprio CHL1 é um sensor de nitrato (HO et al., 2009) (Figura 1). HO et al. (2009) demonstraram que o estado de fosforização do CHL1 (NTR1.1) permite às raízes das plantas perceber e responder às diferentes concentrações de nitrato no solo. O estado de fosforização da uma treonina 101 (T101) do CHL1 é regulado através da concentração de nitrato externo e controla a atividade de transporte e a sinalização. Quando a T101 é fosforilada, o CHL1 funciona como um transportador de nitrato de alta afinidade e sensor, que confere a resposta primária de baixo nível ao nitrato a baixas concentrações de nitrato na solução externa. O CHL1 desfosforilado age como um transportador de baixa afinidade que conduz a uma elevada resposta primária para a alta concentração de nitrato na solução externa (LIU & TSAY, 2003, HO et al., 2009). Isto indica que o CHL1 pode perceber uma extensiva gama de concentrações de nitrato no solo e alterar a atividade de transporte e o nível de sinalização através estado de fosforização. Em bactérias, o sensor de nitrato conhecido é uma quinase de histidina ligada à membrana plasmática chamada NarX (CAVICCHIOLI et al., 1996). Em plantas superiores, há um sistema semelhante de dois componentes envolvido na sinalização de citocinina e etileno, mas nada semelhante foi encontrado para nitrato. Isso demonstra que plantas e bactérias possuem diferentes mecanismos de percepção e sinalização de nitrato.

Estudos recentes identificaram duas proteínas quinase dependentes de cálcio (CIPK8 e CIPK23) envolvidas na fosforização do transportador CHL1 (HO et al., 2009; HU et al., 2009). Tanto CIPK8 como CIPK23 são genes induzidos por nitrato e apresentam baixa expressão em mutantes *chl1* (HO et al., 2009, HU et al., 2009). Assim como a absorção de nitrato, a resposta primária ao NO_3^- também apresenta duas fases. O gene CIPK8 é um regulador positivo responsável pela resposta na fase de baixa afinidade enquanto o CIPK23 é um regulador negativo da fase de alta afinidade. Em resposta a baixas concentrações de nitrato, CIPK23 é responsável por fosforilar o CHL1 na T101, mantendo a resposta de alta

afinidade sob baixa intensidade (Figura 1A). Além disso, o gene CIPK23 também é conhecido por estar envolvido na sinalização de potássio, assim, a caracterização das potenciais interações entre vários CIPKs e a sinalização por diferentes nutrientes poderiam ajudar a entender como a sinalização do nitrogênio está integrada com outros nutrientes.

Além de atuar como um transportador de dupla afinidade, o CHL1 modula a expressão do NRT2.1 (KROUK et al., 2006) através da resposta de sinalização à baixa concentração de nitrato, que envolve a proteína CIPK23 (HU et al., 2009). Nessa condição, a CIPK23 atua como um modulador negativo, mantendo a expressão do NRT2.1 sob baixos níveis. Quando a expressão da CIPK23 é bloqueada, a modulação negativa sobre o NRT2.1 deixa de existir, permitindo níveis mais altos de expressão deste transportador, tanto sob alta como sob baixa disponibilidade de NO_3^- (HU et al., 2009). Um fato curioso, que ainda não foi esclarecido, é como o CHL1, expresso no ápice radicular de *Arabidopsis*, modula a expressão do NRT2.1, que ocorre nas células maduras da epiderme e no córtex da raiz (Figura 1B) (VERT & CHORY, 2009).

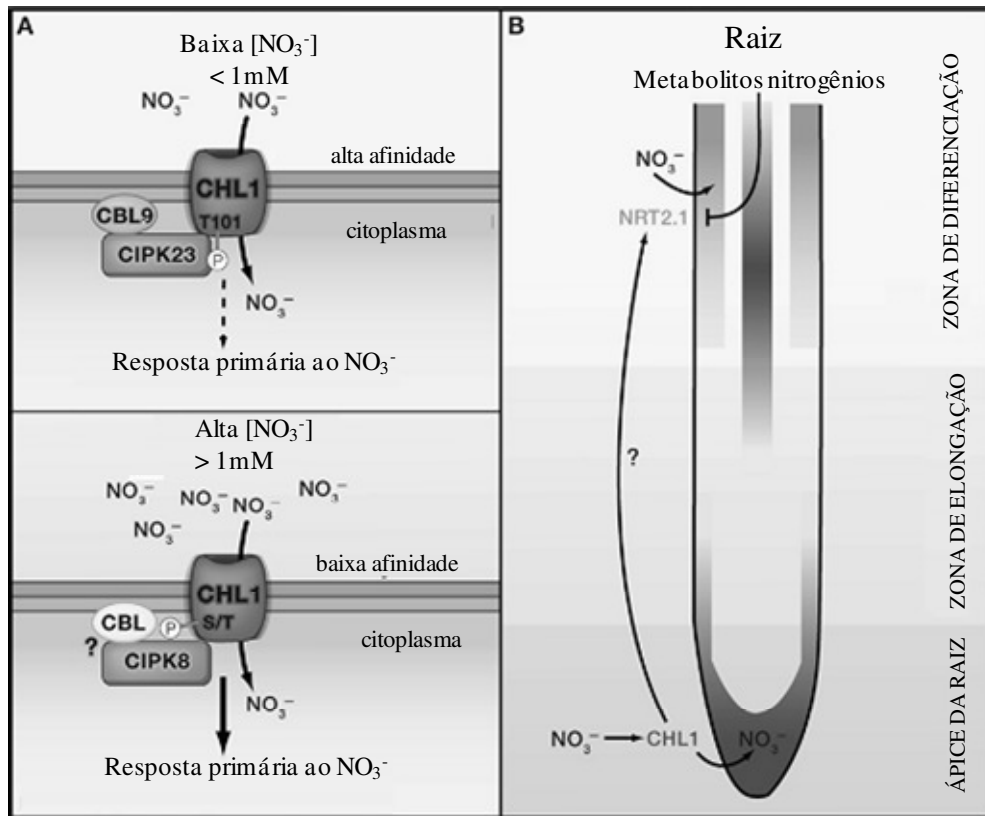


Figura 1. Sinalização por nitrato sob alta e baixa disponibilidade de NO_3^- na solução externa, e indução do transportador NRT2.1 mediado pelo transportador CHL1 (NRT1.1) (Adaptado de VERT & CHORY, 2009). Linhas com uma seta indicam indução, linhas com traço indicam repressão.

Em plantas, o fator de transcrição NLP7 (HU et al., 2009) (um homólogo do gene homólogo ao Nit2 de *Clamidomonas*) e os genes *LBD37*, *38*, *39* foram classificados como reguladores positivos e negativos, respectivamente, para os genes relacionados ao nitrato como os transportadores de nitrato e a nitrato redutase. A expressão do regulador positivo, NLP7, não é regulada por nitrato ou outras fontes de N, enquanto a expressão dos reguladores negativos, *LBD37/38/39*, é induzida por nitrato e em menor intensidade por amônio e

glutamina (RUBIN et al., 2009). De forma interessante, mutantes *nlp7* e *lbd37/38/39* exibem uma resposta de privação de N constitutiva. Diferentes grupos de genes de marcadores de privação de N são induzidos nos mutantes *nlp7* e *lbd37/38/39* mesmo na presença de N, indicando uma relação entre a sinalização pelo nitrato e a sinalização pela privação deste nutriente.

O entendimento do sistema como um todo, pela combinação da genômica e biologia sistemática tem permitido aos pesquisadores a desenvolver e testar hipóteses sobre a regulação nutricional em plantas (RUFFEL et al., 2008). A regulação gênica por anos tem sido considerada a etapa chave da adaptação da plantas às flutuações na disponibilidade de nitrogênio no ambiente (GANSEL et al., 2001 ; KROUK et al., 2006). Devido a isto, abordagens utilizando transcriptoma têm sido utilizadas durante quase 10 anos para identificar reguladores envolvidos na resposta ao nitrogênio, reprogramação da expressão gênica por nitrato. Uma questão que tem intrigado pesquisadores e despertado muita curiosidade é como as plantas percebem as condições do meio externo às raízes, como a disponibilidade de nutrientes. Trabalhos realizados em laboratórios diferentes, utilizando o mutante *chl1*, demonstraram que a função de sinalizador é dependente da situação em que as plantas se encontram (KROUK et al., 2010). Isto foi verificado quando o *CHL1/NRT1.1* não apresentou o comportamento de sinalizador após um período de privação de nitrogênio (WANG et al., 2009). Estas observações demonstram que a sinalização em resposta ao nitrato é complexa e apresenta uma grande adaptabilidade as flutuações de NO_3^- no ambiente. Além disso, estudos mostram que nas raízes, os genes controlados por nitrogênio também são controlados através de sinalização por carbono e luz (KROUK et al., 2009).

2.5 Avaliação da Expressão Gênica

Nos últimos anos, muitos esforços têm sido feitos na busca de meios para melhorar o desempenho de plantas em condições de estresses. Para tanto, não só o conhecimento de vias metabólicas e atividades enzimáticas, mas também, se impulsionou os estudos de genoma (DNA) e transcriptoma (RNA) de plantas, fungos e bactérias. Atualmente, o genoma de plantas como o arroz e *Arabidopsis thaliana* já estão seqüenciados. Além disso, uma grande quantidade de seqüências de RNA, fragmentos de seqüências expressas já foram seqüenciados e depositados em bancos de dados disponíveis à sociedade e novas seqüências continuam sendo encontradas em cada nova pesquisa.

O grande volume de informações acumulado durante esses anos são agora utilizados para auxiliar estudos de genômica funcional. Estes estudos buscam entender qual a função de cada gene ou da proteína codificada, o controle da expressão gênica e suas interações sob determinadas situações. Dessa forma, a análise da expressão gênica tem se tornado uma das mais difundidas técnicas utilizadas em pesquisas biológicas. O seqüenciamento do genoma de alguns organismos, junto com a habilidade de processar e detectar automaticamente um grande número de amostras tem impulsionado muitos grupos de pesquisa no estudo complexo e exigente da expressão gênica em larga escala (LORKOWSKI & CULLEN, 2004). Atualmente, na era pós-genômica, a quantidade dados a respeito de seqüências de DNA/RNA tem incentivado o desenvolvimento de tecnologias para análises de perfis de DNA e RNAm, com grande cobertura do genoma e precisão para cada alvo (YANG et al., 2006). Para isto, varias metodologias para estudos em larga escala de expressão de genes foram e tem sido desenvolvidas ou melhoradas. Dentre as técnicas mais utilizadas atualmente esta o Microarranjo (*Microarray*), que se baseia na hibridação cDNA a sondas específicas para cada gene, fixadas em pequenas placas (slides); técnicas baseadas no seqüenciamento de bibliotecas de cDNA como SAGE (Análise Serial da Expressão Gênica) e SSH (Hibridação Subtrativa Supressiva) e técnicas baseadas em perfil de bandas (*fingerprint*) em géis como o

cDNA-AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado-cDNA). Algumas das vantagens e características destas técnicas são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Características das principais técnicas utilizadas em estudos de expressão gênica em larga escala.

Técnica	Princípio	Vantagens	Desvantagens
SAGE	Seqüenciamento de bibliotecas de cDNA	Grande abrangência de genes, fornece dados quantitativos, identifica novas seqüências	Muito trabalhoso, alta tecnologia e alto custo.
SSH	Seqüenciamento de bibliotecas subtrativas de cDNA	Detectam genes diferencialmente expressos, genes raros e desconhecidos	Trabalhoso, alta tecnologia e alto custo
Microarranjo	Hibridização	Rápido, grande quantidade de dados	Conhecimento prévio dos genes ou genoma.
cDNA-AFLP	PCR utilizando primers seletivos, perfil de bandas	Baixo custo, sensível, diferencia genes similares, dados quantitativos, aplicável a qualquer organismo	Trabalhoso (grande número de reações de PCR).

Além de técnicas para estudos em larga escala, outra muito utilizada para estudos de expressão de genes específicos é a técnica de *Real Time* RT-PCR (Transcrição Reversa seguida de PCR em Tempo Real ou RT-PCR em Tempo Real). Desde que foi descrita, a PCR em Tempo Real tem sido mundialmente utilizada em muitos campos da biologia. Além de utilizada para determinar a expressão de genes específicos, esta técnica também tem sido rotineiramente utilizada para validar resultados de outras técnicas como as descritas anteriormente (TARIS et al., 2008).

Microarranjos de DNA têm sido ferramentas poderosas para análise de expressão gênica em larga escala. Apesar de amplamente utilizado, alguns estudos tem demonstrado discordâncias entres os resultados obtidos por microarranjos produzidos por diferentes empresas (MAH et al., 2004). Por exemplo, TAN et al. (2003) relataram que de 185 genes comuns em célula PANC-1, apenas quatro apresentaram resultados consistentes em plataformas de microarranjos comerciais produzidos pelas empresas Affymetrix, Agilent e Amersham. Uma das maiores razões para isto é devido a nesta época as sondas dos microarranjos não apresentarem especificidade para genes e para *splicing* alternativos, e isto tem encorajado as empresas criar microarranjos com maior especificidade para estes transcritos (KOTHAPALLI et al. 2002; MARSHALL, 2004, FEHLBAUM et al., 2005). Além disso, as discordâncias entre resultados de diferentes plataformas de microarranjos podem resultar de hibridizações cruzadas de seqüências com alta similaridade. As sondas presentes nos microarranjos muitas vezes são constituídas seqüências de cDNA ou produtos de PCR algumas vezes de tamanho maior que mil pares de bases até pequenos oligonucleotideos de 25 a 30 pares de bases (YAUK et al., 2004), enquanto, resultados experimentais tem mostrado que o tamanho ideal para estas sondas é de 150 mer (CHOU et al., 2004). Apesar da grande quantidade genes analisados de uma só vez e a rapidez, essa tecnologia é limitada a poucas espécies devido à necessidade de extenso conhecimento do genoma e seqüências expressas dos organismos em questão. Na técnica SAGE e Hibridação Subtrativa Supressiva (SSH), são geradas bibliotecas de ds-cDNA, e todos os clones são seqüenciados. A princípio, a técnica SAGE fornece dados quantitativos da expressão gênica. No entanto, é uma técnica de alto custo e muito trabalhosa, principalmente quando se pretende comparar muitas amostras (QIN et al., 2001).

2.6 PCR em Tempo Real

Tecnologias baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido implantadas na maioria dos laboratórios da área de ciências biológicas. Uma grande variedade de modificações da PCR tem sido aplicada na detecção de organismos em alimento, ambiente etc. Além disso, a aplicação da PCR em estudos de expressão gênica tem se tornado uma ferramenta comum nas ciências biológicas. A transcrição reversa seguida da PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR em Tempo Real) é atualmente uma das modificações da PCR mais utilizadas técnicas para quantificação de RNAs específicos, principalmente aqueles de baixa abundância.

A PCR em Tempo Real é uma técnica extremamente sensível e econômica para quantificar transcritos de genes de tecidos de plantas (MICHAEL et al., 2008). A disponibilidade de fluoróforos que se ligam inespecificamente em moléculas de DNA de fita dupla, como o SYBR GREEN, e máquinas de PCR com capacidade de acomodar placas com 384 amostras, permite quantificar a fluorescência ao final de cada ciclo de PCR, tornando possível realizar análises de PCR para centenas de genes ao mesmo tempo. Isto tem facilitado a análise comparativa de todos os membros de grandes famílias de genes, tais como fatores de transcrição (CZECHOWSKI et al., 2004). Devido ao custo relativamente baixo dos reagentes e a sensibilidade, precisão, flexibilidade, reproducibilidade da PCR em tempo real (UDVARDI et al., 2008; BURNS et al., 2005), é fácil imaginar porque milhares de laboratórios de pesquisa escolheram esta técnica para quantificar a expressão de genes. A quantificação de moléculas de DNA ou cDNA utilizando PCR em Tempo Real, cada dia mais vem se tornando uma ferramenta comum em pesquisas biológicas (PEIRSON et al., 2003). A introdução da tecnologia de PCR em Tempo Real maximizou e simplificou significativamente a quantificação de ácidos nucleicos e se tornou uma valiosa ferramenta da biologia molecular (KLEIN, 2002).

2.6.1. Princípio da técnica

A PCR é uma reação enzimática, realizada pela enzima DNA Polimerase, que progride em escala exponencial em que a quantidade de produto amplificado dobra após cada ciclo. O procedimento completo da reação é facilitado por ciclos de temperatura que permite a desnaturação do DNA (abertura da fita dupla), anelamento de iniciadores (primers) e síntese de novas moléculas pela enzima. Dessa forma, a reação pode ser representada pela equação:

$$P=T.2^n$$

Em que **P** é a quantidade de produto formado partindo de uma determinada quantidade de inicial **T** após certo número de ciclos **n** e 2 devido a quantidade de produto dobrar a cada ciclo, considerando 100% de eficiência da reação.

Assumindo que a eficiência da reação possa variar, a equação pode ser modificada para:

$$P=T.(1+E)^n;$$

Em que **E** é a eficiência real da reação que pode variar de 0 a 1 (TICHOPAD et al., 2003). A cinética da reação pode ser acompanhada em tempo real utilizando fluoróforos que se ligam as moléculas de DNA sintetizadas ao final cada ciclo e emitem fluorescência que é capturada por aparelhos específicos (SILVA & WITTEWER, 2000).

Os sistemas de PCR em tempo real monitoram a fluorescência emitida a cada ciclo proporcional a quantidade de moléculas de DNA sintetizadas, dessa forma, considerando uma eficiência da reação de 100%, a fluorescência emitida dobra a cada ciclo. Seguindo este

princípio uma amostra como determinada quantidade de moléculas de DNA alvo necessitará de um ciclo a mais de PCR para atingir certo nível de fluorescência (GIBSON et al. 1996).

O número de ciclos necessário para atingir o nível de fluorescência estabelecido é a unidade fundamental de quantificação da técnica, chamada de *ciclo limite* (ou *ciclo threshold*, *Ct*). Assim, se duas amostras são comparadas em um ensaio, a diferença entre os valores de *Ct* expressa em escala exponencial, reflete a diferença ou relação da quantidade de DNA alvo entre as amostras e pode ser expresso pela equação:

$$R = 2^{(Ct_1 - Ct_2)} \text{ ou } R = 2^{(\Delta Ct)},$$

e considerando a eficiência da reação temos:

$$R = E^{(\Delta Ct)};$$

onde **R** é relação da quantidade de DNA alvo entre as duas amostras e *Ct* é um nível de fluorescência estabelecido dentro da fase exponencial da PCR.

2.6.2. Quantificação da expressão gênica

A quantificação da expressão através da PCR em tempo real pode ser realizada de duas formas, quantificação absoluta e quantificação relativa. A quantificação absoluta é possível quando os procedimentos de obtenção da amostra não interferem na reação de PCR. A quantificação do alvo é obtida comparando-se os valores de *Ct* do alvo com valores de *Ct* obtidos a partir de uma curva padrão externa. A curva padrão é feita utilizando amostras com concentrações conhecidas do fragmento alvo, amplificado previamente (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Apesar de o uso de curva padrão fornecer resultados altamente precisos, a construção de curvas padrão exigem muito trabalho e tempo (PFAFFL, 2001).

A quantificação relativa é obtida comparando-se os valores de *Ct* do fragmento alvo com os valores de obtidos para um padrão interno (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). No caso de expressão gênica, o padrão interno também é um RNA, que deve apresentar o mesmo nível de expressão entre os tecidos ou tratamentos estudados. A quantificação relativa é a forma mais prática para análise de expressão e aplicável à maioria dos estudos fisiológicas, como resposta a algum tipo de tratamento (PFAFFL, 2001). Há várias equações para cálculo da expressão relativa, alguns utilizam a eficiência da reação de PCR para o alvo e o padrão interno, outras utilizam apenas os valores de *Ct*, a aplicação dessas equações são discutidas por PFAFFL (2001). No entanto, a equação mais utilizada é a chamada delta *Ct* ($\Delta\Delta Ct$) que utiliza apenas os valores de *Ct* da amostra controle e do tratamento após subtrair os valores de *Ct* dos padrões internos de cada amostra. A equação é:

$$R = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}, \text{ em que } \Delta\Delta Ct = (Ct_a - Ct_p)_{TR} - (Ct_a - Ct_p)_R$$

onde Ct_a e Ct_p representam valores de *Ct* do alvo e do padrão interno, respectivamente, e TR e R representam valores da amostra tratada e referencia ou controle, respectivamente (Livak & Schmittgen, 2001).

Os padrões internos, ou genes de referência, são utilizados para normalizar as amostras, ou seja, corrigir diferenças devido à pipetagem de volumes diferentes ou erros de quantificação do RNA total. Para isso, o nível de expressão do gene usado para normalização na PCR em Tempo Real deve permanecer constante entre células de diferentes tecidos e sob diferentes condições experimentais, caso contrário, podem levar a resultados errôneos (JAIN et al., 2006). A quantificação relativa fornece dados precisos e reproduzíveis, no entanto, é extremamente dependente da estabilidade do padrão interno, deve-se ter cuidado ao escolher os genes que serão utilizados como padrão. Apesar de ser uma técnica extremamente poderosa, a PCR em Tempo Real possui algumas armadilhas sendo a mais importante delas a normalização com um gene endógeno (padrão interno) também chamado de gene referência

(BUSTIN et al., 2004). Segundo GUTIERREZ et al., (2008), apesar da grande quantidade de trabalhos desenvolvidos utilizando PCR em Tempo Real a técnica ainda esta subutilizada devido à existência de resultados inconsistentes, provavelmente resultantes de falha na normalização das amostras.

Assim, a utilização de genes de referência inadequados pode levar a erros de uma ordem de até cem vezes (GUTIERREZ et al., 2008b). Atualmente, muitos trabalhos buscam determinar genes de referência em diferentes condições, tecidos e diferentes espécies como em *Arabidopsis* (CZECHOWSKI et al., 2005; GUTIERREZ et al., 2008 b), arroz (JAIN et al., 2006; KIM et al., 2003), batata (NICOT et al., 2005), café (CRUZ et al., 2009).

2.6.3. Aplicações da PCR em tempo real

O estudo de respostas fisiológicas e processos de desenvolvimento muitas vezes necessitam da análise de vários genes em uma mesma amostra que, dessa forma, pode ser útil para entender a função celular das proteínas codificadas por estes genes (GACHON et al., 2004). No entanto, para comparar perfis de expressão entre vários genes é necessária uma técnica sensível e confiável para evitar erros inerentes a diferentes preparações de RNA. Devido as suas características, a PCR em Tempo Real satisfaz os requisitos necessários para avaliação de expressão de genes, sendo possível analisar vários genes em uma pequena amostra (CZECHOWSKI et al., 2004).

A técnica de PCR em Tempo Real foi utilizada com sucesso para avaliar a expressão de mais de 1400 genes que codificam para fatores de transcrição em *Arabidopsis* (CZECHOWSKI et al., 2004) e 1880 durante a senescência (BALAZADEH et al., 2008). A expressão de fatores de transcrição muitas vezes se da em tecidos ou células específicas ou sob níveis muito baixos (BALAZADEH et al., 2008) o que torna difícil o seu estudo. O genoma de plantas apresenta varias famílias multigênicas, algumas destas podem ter mais de 100 membros com um alto grau de similaridade de seqüências nos domínios de ligação ao DNA o que dificulta analisar sua expressão utilizando microarranjos (CZECHOWSKI et al., 2004).

A utilização de técnicas de estudo de expressão gênica em larga escala como microarranjos permite estudar milhares de genes ao mesmo tempo. Porém, a confiabilidade dos resultados obtidos por microarranjos muitas vezes pode ser questionada devido à possibilidade de ocorrência de hibridização cruzada em casos de genes de alta similaridade (BALAZADEH et al., 2008; GACHON et al., 2004). Além disso, o limite de detecção de microarranjos é de 1 cópia de transcrito por célula enquanto que, a técnica de PCR em Tempo Real possui um limite de 1 cópia em 1000 células (CZECHOWSKI et al., 2004), sendo capaz de detectar até mesmo a repressão de um gene naturalmente pouco expresso como os que codificam fatores de transcrição (BALAZADEH et al., 2008). Dessa forma, uma estratégia utilizada para dar consistência aos resultados de microarranjos é selecionar os genes representativos às respostas observadas e confirmar seu perfil de expressão utilizando PCR em Tempo Real. A técnica foi utilizada para confirmar a expressão de fatores de transcrição GATA em resposta a luz, ciclo circadiano em *Arabidopsis* (MANFIELD et al., 2007). Em arroz, foi utilizada para validar resultados de expressão de proteínas F-Box obtidos por microarranjos (JAIN et al., 2006). Em estudo de expressão da família gênica que codifica para proteínas 14-3-3 em tomate sob salinidade e deficiências minerais foram encontradas duas isoformas possivelmente envolvidas nas respostas a estas duas condições (XU et al., 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento I: Comportamento das Variedades de Arroz IAC-47 (Melhorada) e Piauí (Local) Cultivadas com Alto e Baixo Suprimento de N-NO₃⁻

O experimento foi conduzido em câmara de crescimento na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), com o objetivo de verificar o comportamento das variedades de arroz Piauí e IAC-47 quanto ao metabolismo de nitrogênio e verificar a expressão de genes que codificam para as enzimas de assimilação de nitrogênio, transportadores de nitrato de alta e baixa afinidade, proteínas reguladoras NAR e bombas de prótons de plasmalema sob condições de alto e baixo suprimento de N, por períodos prolongados, em solução nutritiva.

As sementes de arroz foram desinfetadas com hipoclorito de sódio 2,5% por 20 minutos sob agitação e em seguida lavadas dez vezes com água destilada. Depois de desinfetadas, as sementes foram colocadas para germinar na superfície da lamina de água de um vaso, sustentadas por uma gaze. As plantas foram cultivadas em fitotron, com fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com luminosidade aproximada de 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

As plantas foram cultivadas em solução de HOAGLAND & ARNON (1950) a meia força iônica, contendo 2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ e 0,05 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺, até os 15 dias após a germinação (DAG) em vasos de 3,7 litros. Após esse período, um grupo de plantas passaram a receber 0,15 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ (baixo suprimento de N) outro passou a receber 5 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ (alto suprimento de N). Todas as soluções utilizadas continham 0,05 mmol L⁻¹ de N-NH₄⁺ simulando as pequenas quantidades de amônio presentes em solos aerados. As plantas foram cultivadas sob estas condições por mais 10 dias, sendo a solução nutritiva trocada a cada três dias. Após esse período metade das plantas cultivadas a 0,15 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ recebeu alto suprimento de N (5 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻) por duas horas, e metade das plantas cultivadas com 5 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ recebeu baixo suprimento de N (0,15 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻) onde permaneceu por 24h, resultando em quatro condições diferentes de suprimento de N (Figura 2). Os tempos de 2 e 24 horas, nos tratamentos em que a concentração de N na solução foi alterada, foram utilizados para verificar como as variedades respondem a períodos curtos de aumento da disponibilidade de N, e a resposta no metabolismo de N à redução do suprimento de ser mais lenta devido ao conteúdo interno de NO₃⁻ e ao estado nutricional da planta. As plantas foram coletadas, amostras de tecido fresco de 0,5 gramas de raízes, folhas e bainha foram congeladas em N₂ líquido para análise das frações nitrogenadas e açúcares solúveis, extração de proteínas solúveis, atividades enzimáticas e análise de expressão gênica. Amostras de 5 gramas de tecido fresco foram coletadas para extração de vesículas microssomais.

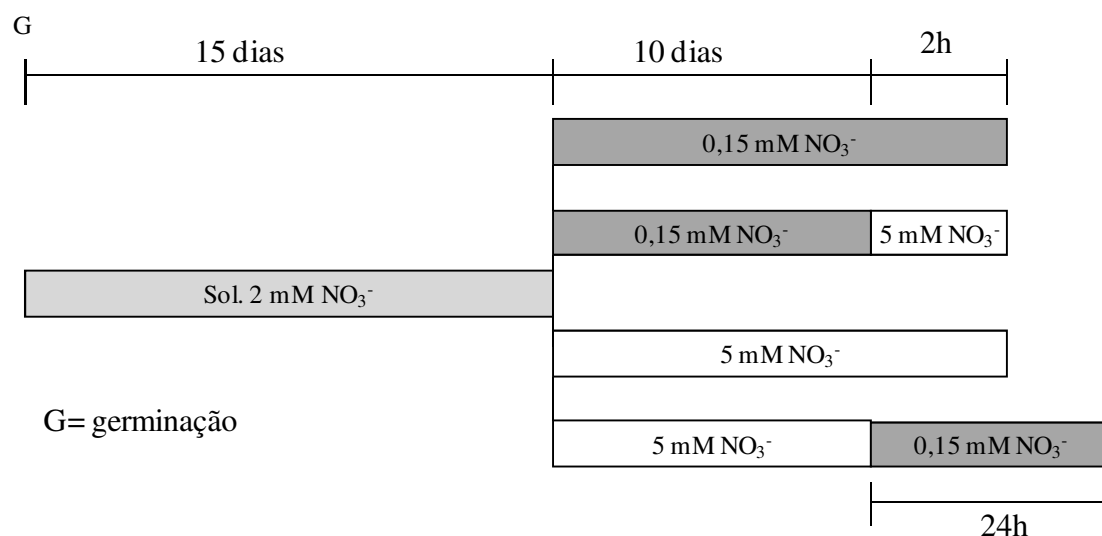


Figura 2. Esquema representativo do Experimento I utilizando as variedades de arroz Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva e submetidas aos 15 dias após a germinação a baixo ($0,15 \text{ mmol L}^{-1}$) e alto (5 mmol L^{-1}) suprimento de N-NO_3^- . Após 10 dias nestes tratamentos as plantas tiveram as soluções trocadas para 5 mmol L^{-1} e $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de N-NO_3^- , onde permaneceram, respectivamente, por duas horas e 24 horas.

3.2 Análise das Frações Nitrogenadas e Açúcares Solúveis

Amostras de 0,50 grama de material coletado das folhas, raízes e bainhas 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).

3.3 Atividade da Nitrato Redutase

A atividade da Nitrato Redutase (ANR) foi avaliada segundo JAWORSKI, (1971). Duzentos miligramas de tecido vegetal fresco foram incubados em 5,00 mL da solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ pH 7,5; N-propanol e KNO_3 25 mmol L^{-1} em banho-maria a 30°C por 1 hora no escuro. Em seguida, foram adicionados 0,40 mL da solução problema; 0,30 mL de sulfanilamida 1%; 0,30 mL de n-naftil-etileno-diamino (0,02%) em outro tubo, deixando-se em repouso por 20 min. Após a adição de 4,00 mL de água, a leitura foi realizada contra um padrão com NaNO_2 . A absorvância foi lida em 540 nm e a ANR foi expressa em $\mu\text{mol de NO}_2^- \text{ g}^{-1}$ de tecido fresco h^{-1} .

3.4 Atividade da Glutamina Sintetase

Amostras de tecido armazenadas a -80°C foram maceradas com nitrogênio líquido e homogeneizada em tampão de extração composto por 50 mmol L^{-1} de Tris-Cl pH=8,0, 1 mmol L^{-1} de EDTA, 1,5% de polivinilpolipirrolidona (PVPP), 10 mmol L^{-1} de dithiothreitol (DTT), 30% de glicerol e 1 mmol L^{-1} de fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), na proporção 3:1 (tampão : amostra). O extrato bruto foi centrifugado a 14.000g durante 30 min e o sobrenadante (extrato protéico) armazenado no freezer a -80°C . O conteúdo de proteína foi determinado como descrito por BRADFORD (1976), usando albumina de soro bovino como padrão. A atividade foi realizada como descrito por FARDEN e ROBERTSEN (1980). A atividade foi

realizada em 500 μL de uma solução contendo 50 mmol L^{-1} de Imidazol-HCl pH 7,5, 5 mmol L^{-1} de hidroxilamina neutralizada com Tris, 20 mmol L^{-1} de MgCl_2 , 25 mmol L^{-1} de L-glutamato, 5 mmol L^{-1} de β -mercaptoetanol e 5 mmol L^{-1} de ATP. O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi iniciada pela adição de 50 μg de proteína já incluídos nos 500 μL da reação e conduzida a 30°C durante 30 min. A reação foi paralisada pela adição de 350 μL de uma solução composta por 4% (p/v) de ácido tricloroacético – TCA e 3,2% (p/v) de cloreto férrico anidro – FeCl_3 preparada em HCl 0,5 mmol L^{-1} . O γ -glutamil monohidroxamato (GHD) foi colorimetricamente determinado em $\lambda=540 \text{ nm}$.

3.5 Isolamento de Vesículas de Plasmalema e Atividade das PM-H⁺-ATPases

Amostras de raízes (5 g de massa fresca) foram trituradas com um mixer em 20 mL do meio de extração contendo: Tris-HCl 50 mmol L^{-1} (pH 8,0), sacarose 250 mmol L^{-1} , glicerol 100 mL L^{-1} , KI 150 mmol L^{-1} , cloreto de colina 100 mmol L^{-1} , EGTA 2 mmol L^{-1} , EDTA 2 mmol L^{-1} , polivinilpirrolidona (PVP) 10 g L^{-1} , fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mmol L^{-1} , ditioneitol (DTT) 5 mmol L^{-1} , 2-mercaptoetanol 5 mmol L^{-1} e 5 g L^{-1} de albumina. O extrato 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 centrifugado a 105.000 g por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, ressuspenso com 0,5 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} , MgCl_2 2 mmol L^{-1} , DTT 2 mmol L^{-1} e PMSF 1 mmol L^{-1} . O material resultante, denominado fração microsomal foram congeladas em N_2 líquido e armazenadas a -80°C para posteriores análises.

A atividade das bombas de prótons de plasmalema, PM-H⁺-ATPases foram determinadas pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP 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), MgSO_4 5 mmol L^{-1} , KCl 50 mmol L^{-1} , Na_2MoO_4 1 mmol L^{-1} , 0,2 mL L^{-1} de Triton X-100, KNO_3 50 mmol L^{-1} , NaN_3 1 mmol L^{-1} e ATP 5 mmol L^{-1} . A reação foi iniciada 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 H_2SO_4 20 mL L^{-1} , SDS 50 g L^{-1} e $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 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 quantificação 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 (Na_3VO_4). A atividade desta proteína foi calculada pela diferença entre a atividade observada sem e com a presença de vanadato no meio de reação.

As concentrações de proteínas dos extratos de GS e Bombas de Prótons foram determinadas pelo método de BRADFORD, 1976, usando soro albumina bovina como padrão.

3.6 Avaliação da Expressão Gênica

3.6.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído utilizando-se o kit RNagent (Promega). Amostras de tecido vegetal foram trituradas em almofariz com nitrogênio líquido e aproximadamente 0,1 g foram transferidos para micro tubos de 2 mL. Em seguida foram adicionados 900 µL da solução desnaturante e 90 µL de acetato de sódio 2 M pH 4,0. Os tubos foram homogeneizados (por inversão, 4-5 vezes), e logo depois foram adicionados 900 µL de Fenol:clorofórmio: álcool isoamilico (125:24:1). Os tubos foram homogeneizados por 10 segundos e mantidos no gelo por 15 min. O homogenato foi então centrifugado a 10.000 x g por 20 min a 4 °C e a fase aquosa transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol e mantido por 1 hora a -20 °C. O RNA foi recuperado por centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75%, homogeneizado por 10 seg. e centrifugado a 10000 x g por 10 min a 4 °C. O RNA foi seco em capela de fluxo e ressuscitado com H₂O-DEPC. A quantidade e qualidade do RNA total foram verificadas através de espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230. Foram utilizadas as amostras que apresentaram razão entre 1,8 e 2,2.

3.6.2 Quantificação do RNA e síntese de cDNA de fita simples

O RNA total foi quantificado em duplicata no espectrofotômetro SmartSpec™ 3000 (BIO-RAD). Três microgramas de RNA total foram tratados com DNase (DNase I Amplification Grade – SigmaAldrich™) seguindo as instruções do fabricante. Três microgramas de RNA foram misturados com 3µL do tampão de reação da DNase I 10X, 3µL da DNase I num volume total de 30µL. A incubação da reação foi conduzida a 25°C por 15 min, seguida da adição de 3 µL de EDTA 50mM e posterior inativação da DNase I a 65°C por 10 minutos. Após a digestão com DNase a qualidade do RNA e a presença de DNA nas amostras foi verificada através de eletroforese em gel de agarose.

A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “TaqMan® Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystem) seguindo as instruções do fabricante.

3.6.3 PCR em tempo real

A expressão dos genes foi realizada através de PCR semi-quantitativa em tempo real (RT-PCR) utilizando iniciadores (*primers*) específicos para os genes em estudo (Tabela 2). Os primers foram desenhados com base nas seqüências da região 3'-UTR (3'-não traduzida) dos RNAm. O gene da actina de arroz foi utilizado como controle constitutivo do experimento. Os produtos de PCR foram detectados com “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). Em todas as reações foi realizada uma curva de *melting* para verificar a presença de produtos inespecíficos.

Tabela 2: Sequências dos primers forward e reverse usados nas reações de PCR em tempo real para os genes de três isoformas de Glutamina sintetase citossólica (GS1.1 e 1.2; GSI), duas isoformas de Glutamina Sintetase plastidial (GS2 e GS2c), duas isoformas de Glutamato sintase (NADH-GOGAT 1 e 2), quatro transportadores de nitrato de alta afinidade (OsNRT2.1 a 2.4), quatro transportadores de nitrato de baixa afinidade (OsNRT1.1 a 1.4), duas isoformas de proteína reguladora NAR (OsNAR2.1 e 2.2), duas isoformas de bombas de prótons (OsOSA2 e 7) e gene controle da Actina (OsAct11) de arroz e números de acesso no banco de dados do NCBI.

Gene	Nº acesso	Forward primer	Reverse primer
<i>OsGS1.1</i>	NM_001054580.1	5'-CCACGACATCCTCGTCATC-3'	5'-CCAGCACAAATGCAATTCAC-3'
<i>OsGS1.2</i>	NM_001055959.2	5'-GAGTCGTGCTCTCCCTTGAC-3'	5'-CTCATCGACTTGGTGCTGAA-3'
<i>OsGSI</i>	NM_001071290.1	5'-ACGGAGCAAAGAGGATTACG-3'	5'-AAAGGACGCGAGAATAAGCA-3'
<i>OsGS2</i>	NM_001060668.1	5'-GGCAAATAAATCCCAGCAA-3'	5'-TTAACTGGCGAATGGAAGGT-3'
<i>OsGS2c</i>	AK063706.1	5'-TGACCGAACTAATGCCTATTCA-3'	5'-TGATATTCGGTCCGTATTTGG-3'
<i>NADH-GOGAT1</i>	NM_001050419.1	5'-GGAGGGAAATCTAATACAGG-3'	5'-AGTTCATCAGCGTTAGTCAG-3'
<i>NADH-GOGAT2</i>	NM_001062809.1	5'-AGACAAACAATTTCCCTGAG-3'	5'-TAAAGGGTCACTTCCAACAT-3'
<i>OsNRT2.1</i>	NM_001052193.1	5'-CGCCGCAACGTCATCAA-3'	5'-GCGTGTTATCATCGAGTCGAACT-3'
<i>OsNRT2.2</i>	NM_001052194.1	5'-CGCCGCAACGTCATCAA-3'	5'-AAACGGTAACAAAACGTTCAACAG-3'
<i>OsNRT2.3</i>	NM_001050538.1	5'-ACGGAGACCGGGATCAAGTA-3'	5'-CCCCTGCGGGAAGTAGATG-3'
<i>OsNRT2.4</i>	LOC_Os01g36720	5'-ACGAAGCTGGTGGAAGAAGAAG-3'	5'-ACGACGCCATCGCCATA-3'

Tabela 2. Continuação.

Gene	N° acesso	Forward primer	Reverse primer
<i>OsNRT1.1</i>	NM_001067555.1	5'-CGAGGTTGGTGCATTTTGTG-3'	5'-GCCGTGGTGTCTCTTTTTTTTT-3'
<i>OsNRT1.2</i>	NM_001064472.1	5'-CAATCTGTAATGCAGGGTAACTGTT-3'	5'-AGCATCCTCAAGACCACCAAA-3'
<i>OsNRT1.3</i>	NM_001053775.1	5'-GAGGTTTGGGTTTTTGAGGTAGTG-3'	5'-CAGGAGATTGAAGCTAGCATCATATC-3'
<i>OsNRT1.4</i>	NM_001074096.1	5'-AATGATCCCTGATTAGGTCAAGTCA-3'	5'-CCAAATACCACTACTCTTGCATCCT-3'
<i>OsNAR2.1</i>	NM_001053852.2	5'-AAGACGCAGGTGTTCTCTCC-3'	5'-ACTTCACCGTGCTTGGGC-3'
<i>OSNAR2.2</i>	NM_001059634.1	5'-ACGATCATGGCTCGGTTTG-3'	5'-CAAGCACCGAGAACTACAAGGA-3'
<i>OsOSA2</i>	NM_001065628.1	5'-GCAGAAGAGGCCCGTAGGA-3'	5'-CAGGGTGGTCAGCTCTCTCAA-3'
<i>OsOSA7</i>	NM_001060653.1	5'-TCGACACGATCCAGCAGAAC-3'	5'-GCTGATGACGATCTCTCGTTGA-3'
<i>OsACT2</i>	NM_001057621.1	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3'	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3'

3.7 Experimento II: Expressão Gênica de Glutamina Sintetase e de Transportadores de Nitrato de Alta e Baixa Afinidade em Resposta ao Ressuprimento de N em Variedades de Arroz Piauí e IAC-47.

As plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 foram cultivadas em solução nutritiva em câmara de crescimento na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRuralRJ), com o objetivo de verificar o comportamento das variedades quanto ao metabolismo de nitrogênio, em resposta ao ressuprimento de N-NO_3^- na solução nutritiva, e verificar a expressão de genes que codificam para a glutamina sintetase e de transportadores de nitrato de alta e baixa afinidade.

As plantas foram submetidas à fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com luminosidade de $230 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura $28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ (diurna/noturna). Nos primeiros 20 dias as plantas foram cultivadas em solução de HOAGLAND e ARNON (1950) a 50% da concentração original e as concentrações de NO_3^- e NH_4^+ modificadas para 1,30 e 0,10 mmol L^{-1} respectivamente, somando $1,4 \text{ mmol L}^{-1}$ de N.

Aos 20 dias após a germinação (DAG) as plantas foram transferidas e permaneceram durante 72 h em uma solução sem nitrogênio (solução controle). Após este período, um grupo de plantas recebeu alta concentração de N-NO_3^- (5 mmol L^{-1}), outro recebeu baixa concentração de N-NO_3^- ($0,15 \text{ mmol L}^{-1}$) e outro recebeu uma nova solução sem N. As coletas foram realizadas antes de aplicar os tratamentos (tempo zero) e 6 e 24 horas após a adição dos tratamentos. A coleta realizada no tempo zero foi utilizada apenas para a análise de PCR em Tempo Real.

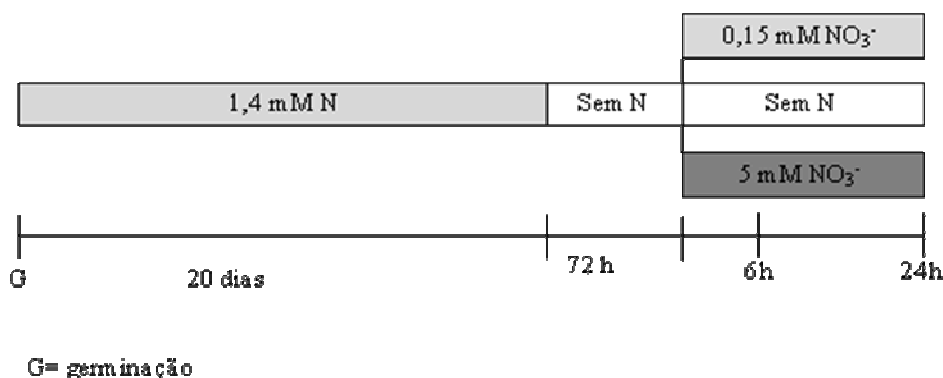


Figura 3. Esquema representativo do Experimento II utilizando as variedades de arroz Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva e submetidas aos 20 dias após a germinação a uma solução sem N. Após 72 horas em solução sem N, as plantas foram separadas em três grupos, um grupo continuou em solução sem N e os outros dois receberam o ressuprimento de N a 5 mmol L^{-1} e $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de N-NO_3^- , as coletas foram realizadas 6 e 24 horas após o ressuprimento.

Amostras de folhas e raízes foram coletadas e armazenadas em etanol 80% para a análise das frações solúveis conforme descrito no experimento I, ou, em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior determinação da atividade da GS (conforme descrito no experimento I) e análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real, conforme descrito no experimento I, das isoformas de Glutamina sintetase, transportadores de nitrato de alta e baixa afinidade e proteína reguladora NAR, utilizando os primers apresentados na Tabela 2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Comportamento das Variedades de Arroz IAC-47 (Melhorada) e Piauí (Local) Cultivadas com Alto e Baixo Suprimento de N-NO_3^- (Experimento I)

O cultivo das plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 por dez dias sob alto ou baixo fornecimento de NO_3^- afetou significativamente o acúmulo de massa seca (Figura 4).

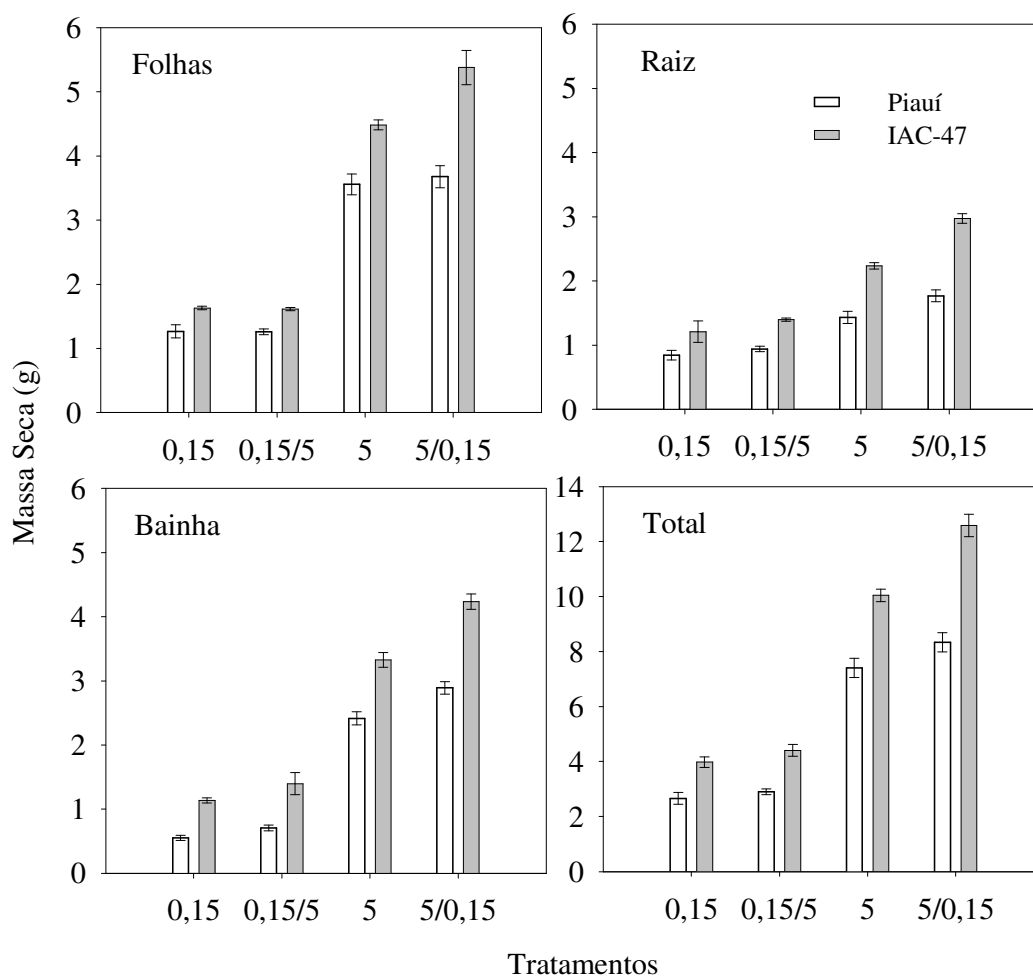


Figura 4. Massa seca de folhas, raízes e bainhas, e massa seca total das variedades de arroz Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. As plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

O cultivo sob baixo nível de N resultou em um decréscimo de 64% e 60% no acúmulo de massa seca nas variedades Piauí e IAC-47, respectivamente, quando comparado com as plantas que receberam alto nível de NO_3^- . O maior acúmulo de massa no tratamento de 5 mmol L^{-1} de NO_3^- foi de 7,4 gramas de massa seca por vaso para a variedade Piauí e 10,04

gramas de massa seca por vaso para a variedade IAC-47, uma diferença de 35% entre variedades. Quando as plantas cultivadas sob 5 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ foram transferida para uma solução contendo 0,15 mM de NO₃⁻ por 24 horas houve uma aumento significativo de 7 % e 20% na massa seca na variedade Piauí e IAC-47, respectivamente, em relação às plantas mantidas a 0,15 mmol L⁻¹ de NO₃⁻. O aumento na massa ocorreu nas três partes da planta, sendo maior nas raízes da variedade IAC-47 (37%). Resultados semelhantes a esses foram observados para essas mesmas variedades quando foi simulado um fluxo de nitrato na solução nutritiva, semelhante ao fluxo sazonal de N que ocorre nos trópicos (SANTOS et al., 2007)

A Eficiência no Uso de Nitrogênio (EUN) pode ser definida como a relação entre produção de grãos por quantidade de N fornecido, e pode ser dividida em eficiência de absorção e eficiência fisiológica de uso (SHI et al., 2010). Estudando uso de N em plântulas de arroz, consideraram o acúmulo de biomassa em relação a fornecimento de N como sendo a eficiência fisiológica de uso, esses autores verificaram um maior acúmulo de massa na variedade com maior EUN. No campo, nesta fase, as plantas estão competindo com as plantas invasoras e outras plântulas em desenvolvimento. Apesar de plântulas maiores (maior biomassa das plântulas) terem mais chances de sobressaírem em uma competição, o rendimento de grãos de uma planta envolve muitos outros fatores além de biomassa. A biomassa da planta, assim como a sua relação com outros fatores, como a atividade de enzimas, pode mudar ao longo do ciclo (da ontogenia) (ZHANG et al., 2010).

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram maior biomassa na variedade IAC-47. Estes resultados estão de acordo com os observados em trabalhos anteriores, em que no início do período vegetativo (primeiros 30 dias), a variedade Piauí apresentou menor massa quando comparada à variedade IAC-47 (GARRIDO et al., 2008; SANTOS et al., 2007). No entanto, trabalhos realizados com essas variedades mostram que com o avanço no desenvolvimento dessas plantas a variedade Piauí passa a apresentar maior massa e maior teor de N, devido ao maior desenvolvimento da parte aérea (plantas mais altas), comparada a variedades IAC-47 (SANTOS et al., 2009a; SOUZA et al. 1998).

As plantas responderam rapidamente à redução no suprimento de N, de 5 mmol L⁻¹ para 0,15 mmol L⁻¹ de NO₃⁻, resultando em um aumento da massa (Figura 4). Plantas de arroz da variedade Caiapó apresentaram um aumento de 30% na massa de raiz quando foram transferidas de uma solução contendo 2,0 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ para uma solução sem N por um período de 72 horas, acompanhado por uma redução nos teores de NO₃⁻ nos tecidos dessas plantas (SANTOS et al., 2009). A indução do crescimento radicular tem sido verificada como uma resposta típica à baixa disponibilidade de nutrientes no solo, principalmente N e P. Em *Arabidopsis* essa resposta envolve os transportadores de N, que por sua vez, parecem controlar a redistribuição de AIA nas raízes (REMANS et al., 2006; SCHEIBLE et al., 1997; LINKHOR et al., 2002).

A relação Raiz:Parte Aérea (R:PA) das plantas foi significativamente afetada pelos tratamentos (

Tabela 3). As plantas cultivadas sob baixa disponibilidade de N apresentaram maior razão Raiz:Parte Aérea. A transferência das plantas cultivadas sob alta disponibilidade de N para uma condição de baixa disponibilidade por 24 horas não alterou a relação R:PA, no entanto, o fornecimento de alto nível de N para as plantas que estavam crescendo sob baixa disponibilidade desse nutriente causou uma redução significativa na relação R:PA. Isso ocorreu, principalmente, devido a uma redução no crescimento radicular nas plantas que passaram de baixo para um alto suprimento de N-NO₃⁻.

Tabela 3. Relação Raiz:Parte Aérea, com base no peso fresco, de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC 47 submetidas a diferentes concentrações de NO_3^- na solução nutritiva.

Variedade	Concentração de NO_3^- (mmol L^{-1})			
	0,15	0,15/5	5	5/0,15
Piauí	0,93Aa*	0,84Ba	0,48Ca	0,50Ca
IAC-47	0,83Ab	0,69Bb	0,52Ca	0,52Ca

A deficiência de N (SCHEIBLE et al., 1997; SCHEIBLE et al., 2004; REMANS et al., 2006; HIRAI, et al. 2004) e fósforo (CAKMAK, et al. 1994; de GROOT, et al., 2003) resultam em acúmulo de carboidratos nas folhas, altos níveis de carbono alocado para as raízes e um aumento da relação raiz parte aérea. A deficiência de N e P afeta em vários níveis a fotossíntese, metabolismo de açúcares e a partição de carboidratos entre os tecidos fonte e dreno. Ao contrário da deficiência de K (CAKMAK, et al. 1994; ZHAO et al. 2001) e Mg (CAKMAK et al. 1994; HERMANS & VERBRUGGEN, 2005) que embora ocasionem acúmulo de açúcares, não promovem aumento da massa radicular.

A disponibilidade de NO_3^- na solução nutritiva teve um efeito significativo sobre os teores NO_3^- nos tecidos das plantas (Figura 5).

As bainhas, principalmente das plantas mantidas sob alto suprimento de N (5 mmol L^{-1} de N-NO_3^-) foram as partes das plantas que acumularam os maiores teores de NO_3^- , enquanto os menores teores foram encontrados nas raízes das plantas transferidas de 5 mmol L^{-1} para $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ por 24h. Isso mostra que a bainha é o principal sítio de acúmulo de NO_3^- nessas plantas o que pode estar relacionado à menor atividade metabólica neste tecido, conforme também observado por SANTOS et al. (2009). Sob alto nível de NO_3^- , a variedade Piauí apresentou teores de N-NO_3^- significativamente maiores nas bainhas e raízes, enquanto que sob baixo nível as plantas da variedade Piauí apresentaram maiores teores de N-NO_3^- em todas as partes (Figura 5).

Os maiores teores de N-NO_3^- foram encontrados na variedade Piauí, principalmente nas bainhas. Apesar das plantas cultivadas sob alto nível de NO_3^- apresentarem um acúmulo de massa em torno de duas vezes maior do que as plantas cultivadas sob baixo nível de NO_3^- , parece não haver efeito sobre os teores de NO_3^- no tecido (efeito de diluição). Isso indica que manter os níveis de N-NO_3^- no tecido é uma característica da variedade Piauí (Figura 4 e Figura 5). Em milho, os teores de NO_3^- nos tecidos parecem ser controlados geneticamente, e apresentam uma alta relação com a eficiência de uso de N (HIREL et al., 2001). Em *Arabidopsis*, a tolerância a baixa disponibilidade de N, verificada pela razão entre a massa de plantas cultivadas sob baixo e alto suprimento de N, apresentaram apenas uma leve redução nos teores de NO_3^- nos tecidos (NORTH et al., 2009), o que reforça os resultados verificados neste trabalho.

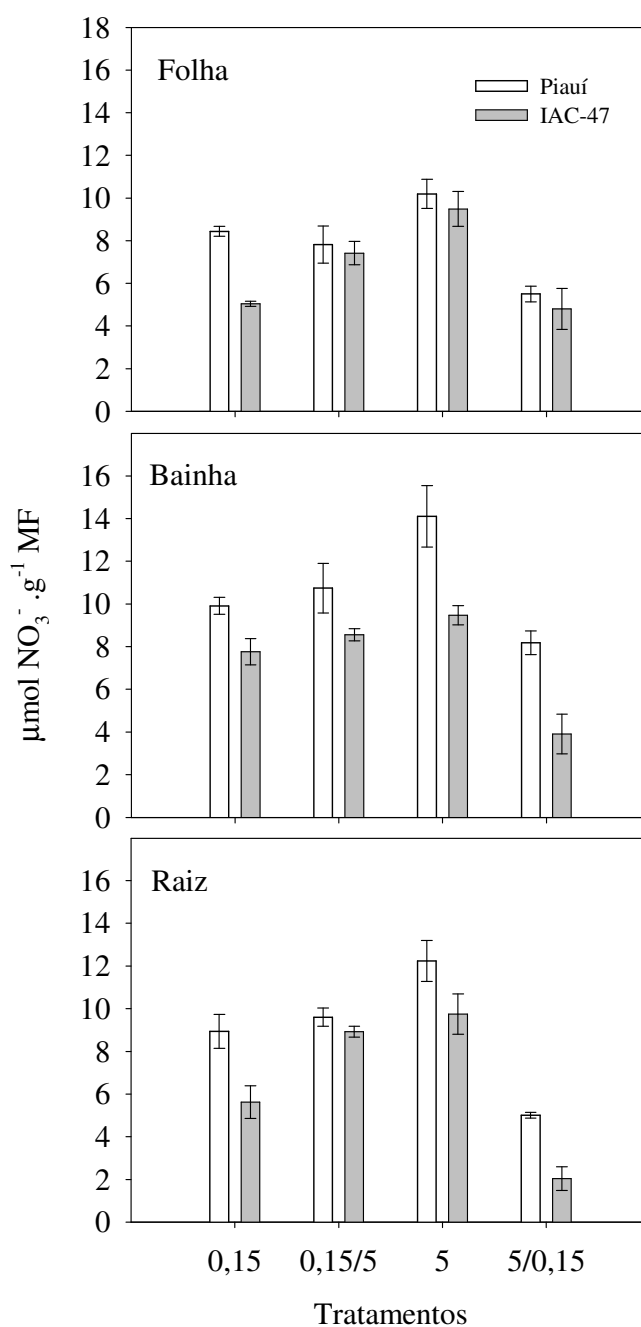


Figura 5. Teores de NO_3^- em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol L^{-1} de NO_3^- . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol L^{-1} de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5 mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol L^{-1} de NO_3^- por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Como pode ser observado na Figura 5 quando as plantas da variedade IAC-47 cultivadas a 0,15 mmol L^{-1} de N passam a receber 5 mmol L^{-1} N (0,15/5) ocorre uma aumento nos teores de N-NO_3^- nas raízes, enquanto que na variedade Piauí não ocorrem grandes variações nos teores de NO_3^- nas mesmas condições. Esse resultado parece indicar que não há aumento de absorção de nitrato pela variedade Piauí, nessa condição, ou o NO_3^- absorvido está sendo rapidamente reduzido e utilizado para a síntese de proteínas. Por outro lado,

quando as plantas cultivadas a 5 mmol L^{-1} passam a receber $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ ($5/0,15$) ocorre uma grande redução de nitrato nos tecidos, sendo maior nas raízes e bainhas da variedade IAC-47. Isso sugere que a variedade Piauí remobiliza o N de uma forma mais eficiente, ou seja, utiliza o estoque de reserva (*pool* de reserva) de uma forma mais eficiente. O excesso de NO_3^- absorvido pelas plantas é transportado para os vacúolos, a favor de um gradiente de potencial eletroquímico por um transportador antiporte (de ANGELI et al., 2006). Esse nitrato armazenado constitui um pool de reserva, que é utilizado quando há ausência de N na solução externa ou durante a senescência, permitindo à planta manter o seu desenvolvimento.

O status de N de uma planta é determinado pelos teores de diferentes moléculas nitrogenadas como nitrato, amônio e aminoácidos no tecido. Tem sido relatado que essas moléculas podem ser sinais do status de N na planta e que podem regular a aquisição de N (MILLER et al., 2008). Em um estudo com plantas mutantes de *Arabidopsis* tolerantes a baixa disponibilidade de N (Int), o acúmulo de NO_3^- em ambos, mutantes e plantas normais, diminuiu com a redução no fornecimento de N de 9 para $0,45 \text{ mmol L}^{-1}$ de N (TENG et al., 2010), o que é consistente com os resultados relatados em outras plantas. No entanto, não houve diferenças significativas nos teores de NO_3^- nos tecidos entre plantas mutantes e normais, ao contrário do que foi observado para a variedade Piauí, que mantém os mesmos teores de NO_3^- na parte aérea, e teores mais elevados que a variedade IAC-47 em todos os tecidos quando cultivada sob baixo suprimento de N (Figura 5). Essa pode ser uma resposta adaptativa a ambientes com baixo suprimento ou suprimento transitório de N, o que ocorre no Maranhão, região de origem dessa variedade.

Os teores de N-NH_4^+ nos tecidos das plantas variaram significativamente ($P > 0,001$) em resposta ao fornecimento de N-NO_3^- na solução nutritiva (Figura 6) nas três partes das plantas. Quando as plantas cultivadas sob baixo suprimento de N passaram a receber 5 mmol L^{-1} ocorreu um aumento significativo no teores de N-NH_4^+ nas folhas da variedade IAC47. Na variedade Piauí, o aumento no suprimento de N não alterou os teores de N-NH_4^+ , no entanto, os teores de N-NH_4^+ nas folhas da variedade Piauí foram maiores quando as plantas estavam sob baixo suprimento de N (Figura 6), o mesmo acontecendo com os teores de N-NO_3^- (Figura 5). Os maiores teores de N-NH_4^+ foram observados nas folhas das duas variedades quando cultivadas sob alto suprimento de N-NO_3^- na solução. O suprimento de $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de N por um período de 24 horas às plantas cultivadas anteriormente sob alto suprimento de N causou uma redução significativa de 1,60 e 2,5 vezes nos teores de N-NH_4^+ nas folhas das variedades Piauí e IAC-47, respectivamente. Foram verificadas relações positivas entre os teores de N-NO_3^- e N-NH_4^+ na variedade Piauí ($R=0,62$) e a variedade IAC-47 ($R=0,68$). Os resultados sugerem que os teores de N-NH_4^+ estão relacionados com o fluxo de N-NO_3^- na planta.

Nas bainhas, os teores de N-NH_4^+ foram maiores na variedade Piauí, exceto quando as plantas foram transferidas de 5 mmol L^{-1} para $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de N por 24h. Quando as plantas cultivadas sob baixo suprimento de N passam a receber 5 mmol L^{-1} de N, os teores de N-NH_4^+ aumentam significativamente na variedade Piauí, não diferindo dos valores observados nas plantas sob alto suprimento de N. Nas raízes os maiores teores de N-NH_4^+ foram observados nas plantas sob alto suprimento de N, enquanto os demais tratamentos não se diferiram, com exceção da variedade IAC-47 transferida de 5 mmol L^{-1} para $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de N por 24h, que apresentaram os menores teores de N-NH_4^+ .

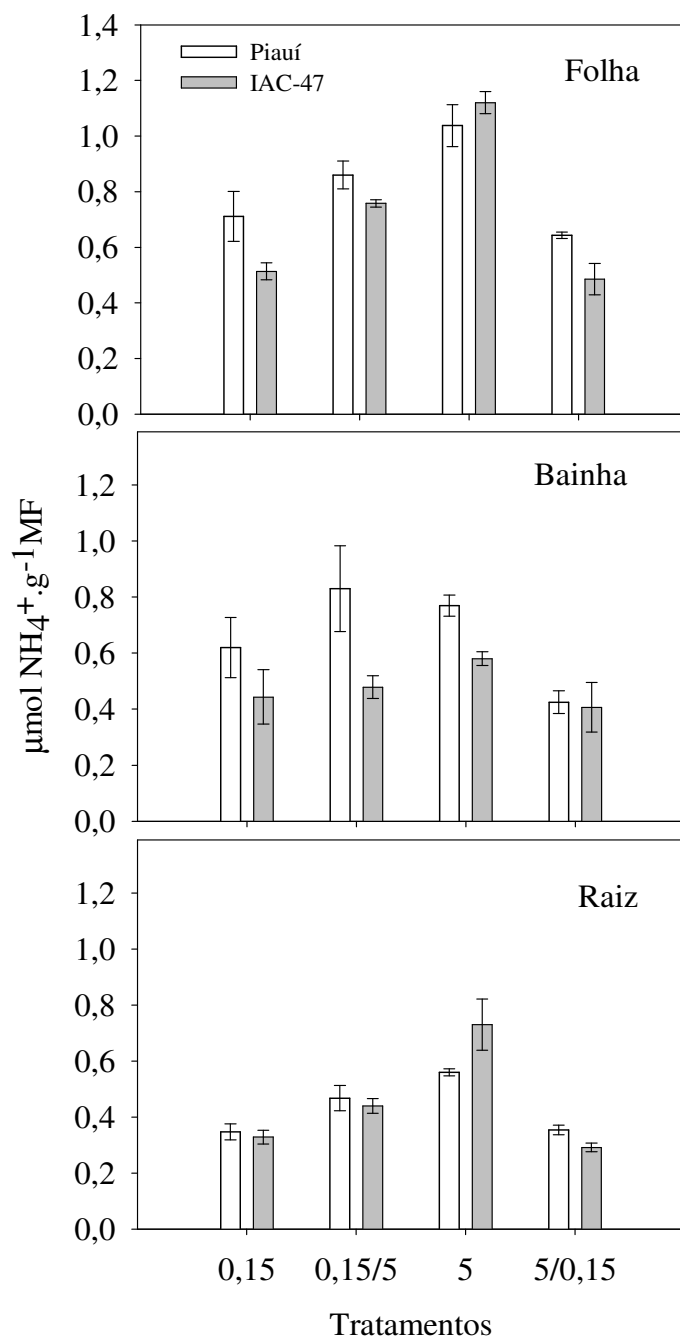


Figura 6. Teores de N-NH_4^+ em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol L^{-1} de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5 mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol L^{-1} de NO_3^- por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Os teores de N-NH_4^+ nas raízes da variedade IAC-47 foram maiores que os observados na variedade Piauí apenas nas plantas sob alto suprimento de N, não sendo observadas diferenças entre variedades nos outros tratamentos. O baixo suprimento de N na solução nutritiva causou uma significativa redução nos teores de N-amino nas folhas das duas variedades (Figura 7). Não houve diferenças entre variedades quando as plantas foram cultivadas sob baixo e alto suprimento de N por 10 dias, no entanto, a alteração no suprimento de N, tanto o aumento como a redução do suprimento, causou variações nos teores de N-

amino nas folhas das variedades. Quando as plantas da variedade Piauí, supridas com baixo nível de N, recebem um alto suprimento de N por duas horas ocorre um aumento significativo nos teores de N-amino, atingindo valores maiores do que os da variedade IAC-47, e iguais aos valores observados nas plantas mantidas constantemente sob alto suprimento de N. A redução no suprimento de N por 24 horas causou uma redução significativa nos teores de N-amino, nas duas variedades, porém a variedade Piauí manteve teores maiores do que a variedade IAC-47.

Como pode ser observado na Figura 7 os teores de N-amino nas bainhas foram menores do que nas folhas, porém, foram afetados da mesma forma pelo suprimento de N. No entanto, os teores foram significativamente maiores na variedade Piauí.

Nas raízes ocorre um pequeno aumento nos teores de N-amino, significativo na variedade Piauí, quando as plantas cultivadas sob baixo suprimento de N passam a receber 5 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ na solução nutritiva. Assim como nas folhas e bainhas, ocorre uma redução nos teores de N-amino nas raízes das duas variedades, quando o suprimento de N é reduzido por um período de 24 horas (Figura 7).

Trabalhos anteriores mostraram resultados semelhantes aos observados, quando o aumento nos teores de N-NO₃⁻ nos tecidos, quando as plantas foram submetidas a um fluxo sazonal de N-NO₃⁻ (SANTOS et al., 2007), assim como a aplicação foliar de URAN (uréia, amônio e nitrato) (SOUZA et al., 1999) e o alto suprimento de N-NO₃⁻ (SANTOS et al., 2009a) levou a um aumento nos teores de N-amino livre em plantas de arroz.

Mutantes de *Arabidopsis* tolerantes a baixo suprimento de N (Int1) apresentaram teor mais elevado de aminoácidos totais livres nas folhas e nas raízes, tanto sob alto como baixo nível de nitrogênio, quando comparadas com as plantas normais (TENG et al., 2010). A diferença entre as plantas aumentou com a redução na disponibilidade de N. Nos níveis mais baixos de N de 0,9 e 0,45 mmol L⁻¹, onde o teor de aminoácidos livre nas folhas e raízes das plantas mutantes (Int) foram aproximadamente 2 e 1,5 vezes superiores aos das plantas normais, em peso, respectivamente (TENG et al., 2010). Segundo os autores, os resultados indicam que os mutantes têm uma maior capacidade de assimilação de amônio, resultando em maiores teores de aminoácidos nos tecidos.

A absorção de nitrato em raízes é controlada pelo status de N da planta. O gene NRT2,1, em *Arabidopsis*, que codifica um transportador de nitrato de alta afinidade é o principal alvo deste mecanismo de sinalização (GIRIN et al., 2010). Plantas de *Arabidopsis* mutantes, insensíveis ao alto status de N, não mostraram diferenças significativas nos teores de N total e N-NO₃⁻ nos tecidos. No entanto, esses mutantes apresentaram diferenças no conteúdo de aminoácido, ácidos orgânicos e açúcares, sugerindo uma possível participação desses metabólitos no controle da absorção de NO₃⁻ através do status de N da planta.

Nas folhas, não houve diferenças nos teores de açúcares entre as variedades, no entanto, os teores de açúcares foram afetados pelo fornecimento de N (Figura 8).

Na variedade Piauí não houve diferenças entre os teores de açúcares nas folhas das plantas cultivadas sob suprimento constante de 0,15 e 5 mmol L⁻¹ de N, e nas plantas que permaneceram por 24 horas sob 0,15 mmol L⁻¹ de N. No entanto, quando as plantas cultivadas sob baixo suprimento de N passam a receber 5 mmol L⁻¹ de N, ocorre uma redução no teor de açúcares quando comparadas às plantas cultivadas sob alto suprimento de N. Os teores de açúcares solúveis nas folhas mostraram uma correlação negativa (R= -0,53) significativa (P< 0,05) com a atividade de glutamina sintetase (Figura 10). Isso indica que a redução nos teores de açúcares pode ser devido a utilização destes na assimilação de N como fonte de energia e esqueletos de C.

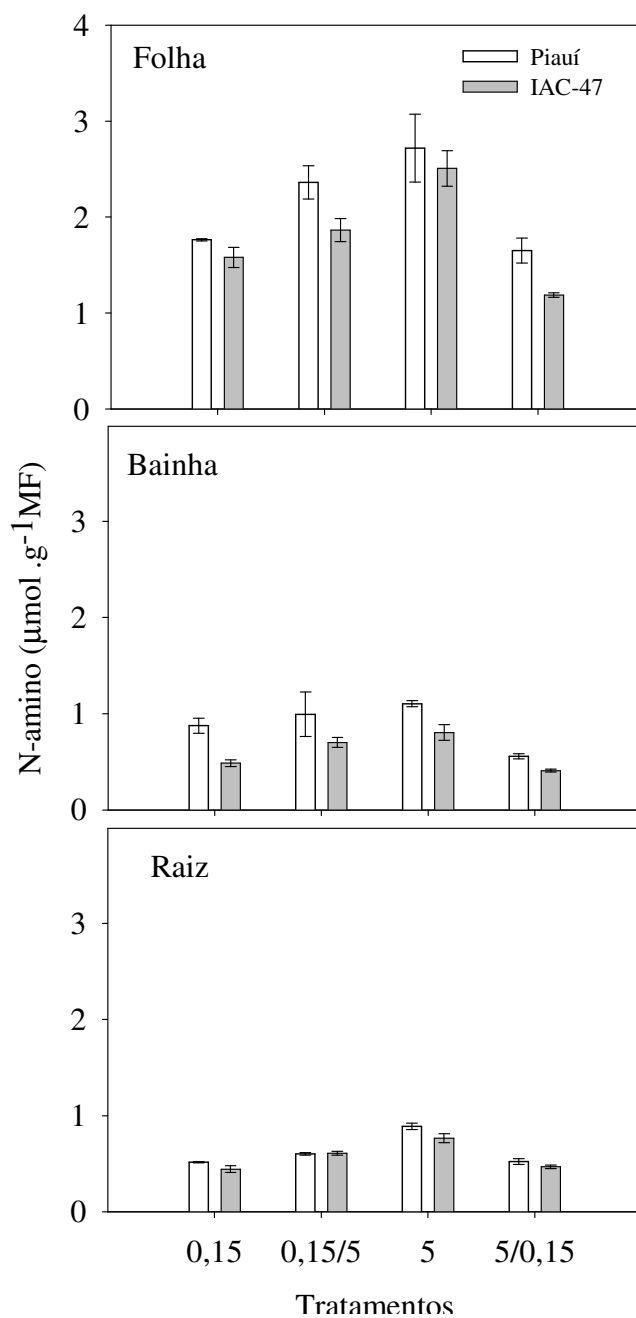


Figura 7. Teores de N-amino em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol L^{-1} de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5 mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol L^{-1} de NO_3^- por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Na variedade IAC-47, ocorreu um aumento nos teores de açúcares solúveis nas folhas das plantas que passam a receber baixo suprimento de N por 24 horas, que pode ser devido a uma menor assimilação de N, resultando nos menores teores de N-amino (Figura 7 e Figura 8). Nas bainhas, os maiores teores de açúcares foram observados nas plantas sob alto suprimento de N, porém, não houve diferenças entre variedades (Figura 8). As raízes apresentaram os menores teores de açúcares solúveis. A alteração do suprimento de N, de baixo para alto suprimento e vice versa, não alterou os teores de açúcares nas raízes da variedade Piauí, porém, a redução do suprimento de N causou um aumento significativo das

raízes da variedade IAC-47 e um leve aumento, não significativo, quando ocorre aumento no suprimento de N. Quando é realizada uma redução no suprimento de N, os teores de açúcares nas raízes da variedade IAC-47 atingem valores superiores aos da variedade Piauí. A assimilação de N requer uma grande quantidade de energia, que é fornecida pela fotossíntese e translocada até as raízes principalmente na forma de sacarose. Os açúcares solúveis são energia prontamente disponível para os processos celulares (FERNANDES, 1984), e assim o seu teor na célula pode variar em função da atividade metabólica.

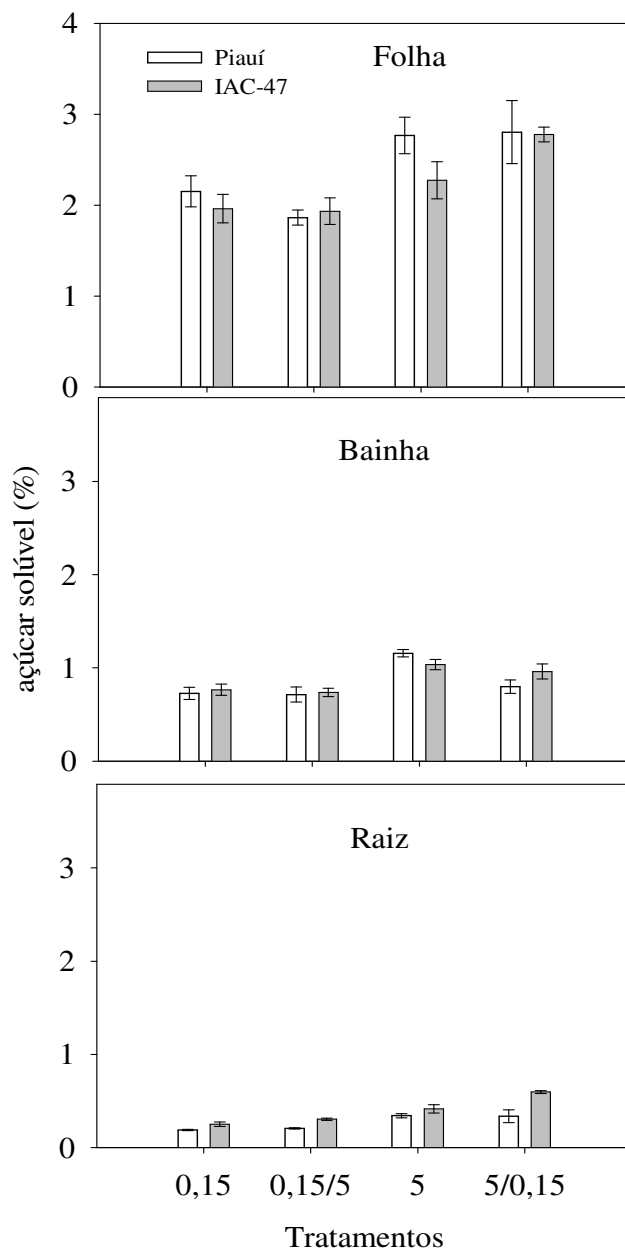


Figura 8. Teores de açúcares solúveis em folhas, bainhas e raízes plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol L⁻¹ de NO₃⁻. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol L⁻¹ de NO₃⁻ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Em resposta à redução da disponibilidade de nutrientes as plantas aumentam a síntese de proteínas (transportadores, enzimas) e aumentam o crescimento do sistema radicular para explorar um maior volume de solo e aumentar a captação de nutrientes. Assim, é possível que na variedade Piauí esteja ocorrendo um aumento do consumo de açúcares não só para crescimento radicular, mas também nos mecanismos de transporte e na formação de potências de membrana para aumentar a eficiência na absorção N. Na variedade IAC-47 é possível que isto não esteja ocorrendo ou esteja ocorrendo em menor intensidade, permitindo o acúmulo de açúcares (Figura 8).

A Atividade da Nitrito Redutase (ANR) variou em função da disponibilidade de N e entre as variedades (Figura 9). Sob suprimento constante de N a variedade Piauí mantém os mesmos valores de ANR, independente do nível de N, no entanto, quando as plantas foram cultivadas sob baixo suprimento de NO_3^- passam a receber um alto suprimento de NO_3^- , ocorre uma redução significativa na ANR nessa variedade. Sob baixo suprimento de N, a variedade IAC-47, apresentou valores de ANR quatro vezes menores nas folhas, além disso, ao contrário da variedade Piauí, ocorre um aumento de 5 vezes na ANR na variedade IAC-47 quando as plantas passam de baixo para alto suprimento de N. A redução no suprimento de N não afetou a ANR nas folhas das duas variedades (Figura 9).

Os maiores valores de ANR nas raízes foram observados nas plantas sob alto fornecimento de N, sendo maiores na variedade Piauí. Ao contrário do que ocorreu nas folhas, a redução no suprimento de N causou uma grande redução na ANR nas raízes. Esta redução na ANR nas raízes observada nas duas variedades, quando as plantas são transferidas de 5 para 0,15 mmol de L^{-1} de NO_3^- , ocorre provavelmente, devido ao menor influxo de NO_3^- assim como a redução do conteúdo de NO_3^- nos vacúolos nesta condição. A ANR está relacionada ao fluxo de NO_3^- no citosol. Assim como nas folhas, a ANR foi menor nas raízes da variedade IAC-47 sob baixo suprimento de N constante, e o aumento do suprimento de N causou um aumento na ANR nas raízes da variedade IAC-47 e uma redução da ANR nas raízes da variedade Piauí (Figura 9).

A ANR está relacionada aos teores de NO_3^- do citosol da célula e não ao NO_3^- armazenado nos vacúolos (COCKSON et al., 2005), que representa o maior pool de NO_3^- na célula. A maior ANR na variedade Piauí observada na Figura 9, quando sob baixo suprimento de N, principalmente nas folhas, sugere a ocorrência de um maior influxo de NO_3^- nessa variedade nessa condição. Isso se torna mais evidente quando relacionamos a maior ANR com os maiores teores de N- NO_3^- do tecido. Estes resultados estão de acordo com os parâmetros cinéticos apresentados por essas variedades, onde a variedade Piauí apresenta maior velocidade de influxo e menor K_M quando submetida a 0,20 mmol L^{-1} de N- NO_3^- o que mostra a sua maior eficiência na absorção de N- NO_3^- (SANTOS et al., 2011).

Sob baixo suprimento de N, a ANR foi maior na variedade Piauí, principalmente nas folhas, sugerindo um maior influxo de NO_3^- nessa variedade. Quando as plantas cultivadas sob baixo suprimento de NO_3^- recebem um alto suprimento de NO_3^- , ocorre uma redução na ANR nas folhas e raízes da variedade Piauí e um grande aumento na ANR na variedade IAC-47 (Figura 9). Na variedade Piauí, quando as plantas passam de baixo para alto suprimento de N, ao contrário da ANR, há um aumento nos teores de N- NH_4^+ (Figura 6) e N-amino (Figura 7). A redução do N- NO_3^- , que se inicia pela ação da NR, termina com a formação de N- NH_4^+ , através da Nitrito redutase (NiR), que por ser tóxico, é rapidamente assimilado em esqueletos de C, formando aminoácidos. Dessa forma, era esperado um aumento na ANR, assim como ocorre nos teores de N- NH_4^+ e N-amino (Figura 6 e Figura 7). Porém, a NR é inibida por formas de N reduzidas, como N-amino, por um sistema de *feedback* negativo (SIVASANKAR et al., 1997; STITT et al., 2002). É provável que na variedade Piauí esteja ocorrendo este efeito de *feedback* negativo sobre a ANR devido ao aumento nos teores de N-amino que ocorre na variedade Piauí e não na variedade IAC-47 (Figura 7 e Figura 9). Esta

redução na ANR pode favorecer o acúmulo de NO_3^- nos tecido nesta condição, enquanto que variedade IAC-47 há um grande aumento da ANR, mostrando uma característica de rápida redução do NO_3^- absorvido por essa variedade.

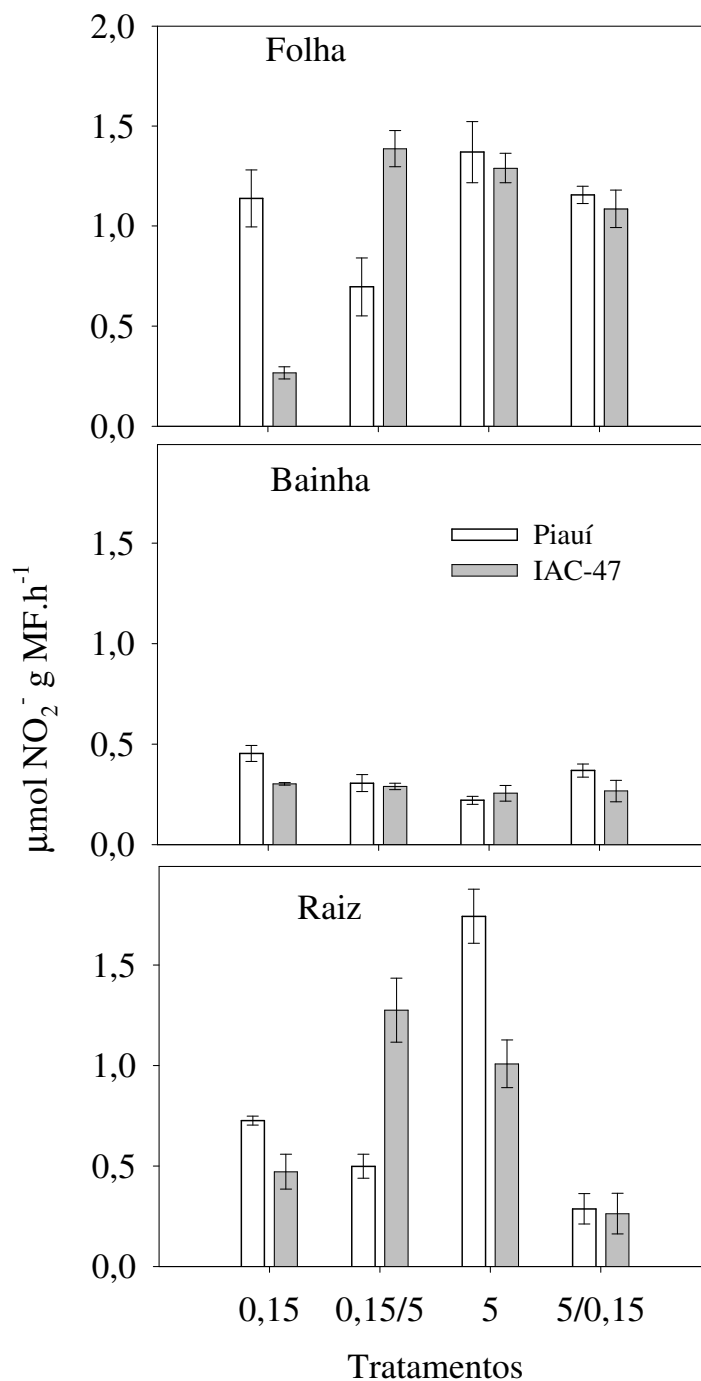


Figura 9. Atividade da nitrato redutase em plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol L^{-1} de NO_3^- . Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol L^{-1} de NO_3^- foram transferidas para soluções contendo 5 mmol L^{-1} de NO_3^- por duas horas (0,15/5) e 0,15 $\text{mmol de NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Nas plantas sob alto suprimento de N, a ANR é elevada apesar dos elevados teores de N-amino. Este resultado pode estar relacionado à composição do pool de aminoácido nestas plantas. O primeiro aminoácido formado a partir da assimilação do N-NH₄⁺ é a glutamina. A glutamina é o principal aminoácido envolvido na sinalização do status de N nas plantas e no controle por *feedback* negativo de alguns genes do metabolismo de N, podendo exercer um papel de molécula sinalizadora (FORDE & LEA, 2007). Devido às plantas estarem sob alto fornecimento de N por um longo período, pode ter ocorrido um ajuste a essa condição permitindo a maior ANR (Figura 9).

Em plantas de arroz contrastantes quanto ao uso de N, não foram verificadas diferenças na ANR nas raízes, o que poderia significar que não há diferenças na taxa de redução de nitrato entre as plantas estudadas (SHI et al., 2010). Deve-ser ter cautela nessa avaliação, pois a ANR pode não refletir a taxa de redução real de nitrato. Além disso, SHI et al. (2010) determinaram a atividade *in vitro* apenas na presença de NADH, o que pode alterar o resultado, pois a ANR pode ser modulada pelos níveis de NADH e a relação NADH/NAD endógena (NUNES-NESI et al., 2010). O protocolo utilizado no presente trabalho (JAWORSKI, 1971), representa melhor a atividade real de NR, pois determina sua atividade *in vivo*, estando assim, a enzima sob condições mais próximas do fisiológico. Além disso, as concentrações de NH₄⁺ e NO₃⁻ no solo não refletem a taxa de absorção. A absorção de N, tanto na forma de nitrato quanto de amônio, pode ser afetada por fatores internos das plantas tais como N ou carboidratos, e por fatores externos como temperatura, nível de O₂ e pH da rizosfera, etc. (MALAGOLI, 2004). O estágio de desenvolvimento também pode afetar a absorção de N. Muitos trabalhos têm demonstrado que a presença de NH₄⁺ na solução nutritiva inibe a absorção de NO₃⁻ (CLARKSON et al., 1986; MACDUFF & JACKSON, 1991). Como consequência, há interação entre a absorção de NH₄⁺ e NO₃⁻.

Houve efeito dos tratamentos na atividade da Glutamina Sintetase (GS) na folhas e raízes (Figura 10). Nas bainhas não ocorreram alterações na atividade de GS, assim com observado para a atividade da nitrato redutase. A menor atividade de GS nas bainhas, relacionada a uma menor ANR está de acordo com os resultados de SANTOS (2006).

A atividade de glutamina sintetase foi maior nas raízes e folhas das plantas cultivadas por um longo período sob baixo suprimento de N (Figura 10). Nessa condição, a atividade de GS foi maior nas folhas da variedade IAC-47, porém, quando as plantas passam de baixo para alto suprimento de N ocorre um leve aumento na atividade de GS nas folhas da variedade Piauí, porém não significativo. A atividade da GS segue a mesma tendência dos teores de N-amino. O aumento na atividade da GS na variedade Piauí, se reflete nos aumentos nos teores de N-amino (Figura 7 e Figura 10) nas folhas dessa variedade. Na variedade IAC-47 a atividade da GS não é alterada assim como os teores de N-amino.

A maior atividade de GS poderia resultar em um acúmulo de N-amino nos tecidos, principalmente glutamina e glutamato (MILLER et al., 2004). Altos níveis endógenos ou exógenos de aminoácido podem inibir a absorção de N inorgânico pelas raízes através da supressão da transcrição de genes que codificam transportadores de N inorgânico. Isso foi demonstrado fornecendo-se aminoácidos para as raízes de diferentes tipos de plantas e, em geral inibem tanto a absorção de nitrato e transcrição de transportadores de NO₃⁻ (VIDMAR et al., 2000). Em *Brassica napus*, por exemplo, o fornecimento dos aminoácidos Gln, Glu ou Asn diminuiu o influxo de NO₃⁻ e a expressão dos transportadores de NO₃⁻ (BEUVE et al., 2004). No entanto, apesar da alta atividade de GS nas raízes sob baixo suprimento de N, não foi observado aumento nos teores de N-amino neste órgão. Isso sugere que ocorre uma rápida translocação do N assimilado nas raízes para a parte aérea, o que poderia explicar os maiores teores de N-amino nas bainhas da variedade Piauí (Figura 7), pois este N-amino pode estar localizado no xilema das bainhas. Plantas de arroz superexpressando *OsENOD93.1*

apresentaram alto teor de N-amino nas raízes e xilema sob baixo N, e aumento da EUN (BI et al., 2009).

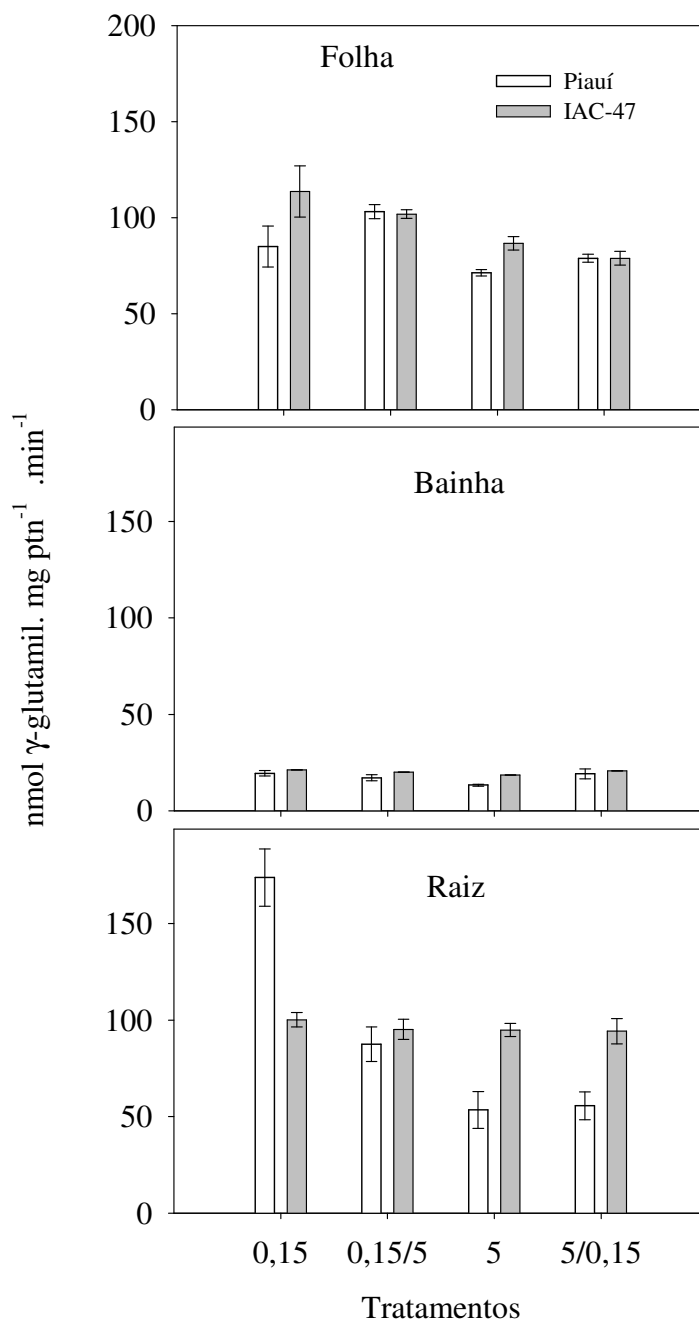


Figura 10. Atividade de Glutamina Sintetase em plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

A maior atividade de GS sob baixo suprimento N indica que esta ocorrendo produção de NH_4^+ que pode ser devido à maior ANR nas raízes da Piauí (Figura 6 e Figura 9) Dessa forma, sob condições com elevada produção de NH_4^+ , a maior atividade de GS ajudaria a

manter baixa concentração de amônio na célula evitando seus efeitos tóxicos (LOTHIER et al., 2011).

Em um estudo comparando a resposta de duas variedades contrastantes na EUN no estágio de plântulas, não houve diferenças na atividade de GS nas raízes quando cultivadas sob condições alta disponibilidade de N (SHI et al., 2010). No entanto, após oito dias sob baixo suprimento de N a variedade com maior EUN passa a apresentar maior atividade de GS assim como de NADH-GOGAT. Os resultados observados por SHI et al. (2010) são semelhantes aos resultados apresentados aqui (Figura 10).

Além da atividade da GS nas raízes, foi analisada a expressão relativa de quatro isoformas de GS encontradas em arroz, sendo três citosólicas (OsGS1.1; OsGS1.2 e OsGSI) e uma plastídial (OsGS2) (Figura 11). Apenas duas isoformas apresentaram respostas aos tratamentos, uma delas codifica para uma isoforma citosólica (OsGS1.2) e a outra para uma isoforma plastídica (OsGS2). A expressão do gene OsGS1.2 aumentou quando as plantas da variedade Piauí passam de um baixo para alto suprimento de N. A redução do suprimento de N, assim como o baixo suprimento constante, causa uma redução de 50% na expressão da OsGS1.2 na variedade IAC-47, enquanto que na variedade Piauí não ocorre alteração nesses tratamentos. A expressão do gene OsGS2 ocorre de uma forma semelhante ao OsGS1.2. Nas raízes das plantas da variedade IAC-47 sob baixo suprimento de N, há uma redução de sete vezes na expressão do gene OsGS2 quando comparado às plantas sob alto suprimento. Na variedade Piauí há uma redução de 2 vezes. No entanto, as resposta da expressão do gene OsGS2 à variação do suprimento de N são maiores na variedade IAC-47, ocorrendo um aumento de 4 vezes na expressão quando ocorre aumento não suprimento de N (0,15/5), e uma redução de 10 vezes quando ocorre uma redução no suprimento de N (5/0,15) (Figura 11). Estes resultados mostram que apesar da expressão destes genes responderem aos tratamentos nas duas variedades, a variedade Piauí parece manter níveis mais constantes de expressão, ou uma menor redução na expressão sob condições de baixo suprimento de N.

Embora a atividade de GS tenha sido significativamente maior nas raízes da variedade Piauí cultivada sob baixo suprimento de N comparado ao tratamento com alto suprimento de N, não foi verificado aumento semelhante na expressão dos genes que codificam para isoformas de GS (Figura 10 e Figura 11). Estes resultados podem estar relacionados ao controle da atividade das enzimas e não propriamente da expressão dos genes. O aumento na expressão ou na atividade de GS parece não se relacionar sempre com desenvolvimento das plantas. Em plantas *Lotus japonicus* superexpressando uma GS1 foi verificada uma correlação negativa entre a atividade de GS na raiz e o acúmulo de biomassa nas plantas (LIMAMI et al., 1999). Neste trabalho a atividade de GS contribuiu para 13% na variação de acúmulo massa das plantas. Além disso, observou-se que o menor acúmulo de massa estava associado ao acúmulo de NO_3^- nas folhas das plantas, onde, em *Lotus japonicus*, a ANR é bastante reduzida impossibilitando a utilização do N-NO_3^- . Porém, diferente de *Lotus Japonicus*, plantas de arroz possuem a capacidade de assimilar NO_3^- tanto em raízes quanto em folhas e, a maior massa na variedade Piauí (Figura 4) parece depender do estágio de desenvolvimento. Além disso, estudos em que a superexpressão de uma GS1 (isoforma GS15) de soja foi feita utilizando os promotores 35S (constitutivo) e *rolD* (específico de raiz) (FEI et al., 2003), apenas uma linhagem com alta atividade de GS nas raízes apresentou redução de biomassa. No entanto, em outras linhagens utilizadas por FEI et al. (2003) o acúmulo de N e de biomassa não foi afetado pelo aumento de expressão e atividade de GS na raiz, além disso, os resultados foram afetados pela disponibilidade de NO_3^- . Segundo FEI et al., o aumento da expressão do gene não resulta diretamente no aumento da atividade da enzima ou mesmo com o acúmulo de biomassa e N.

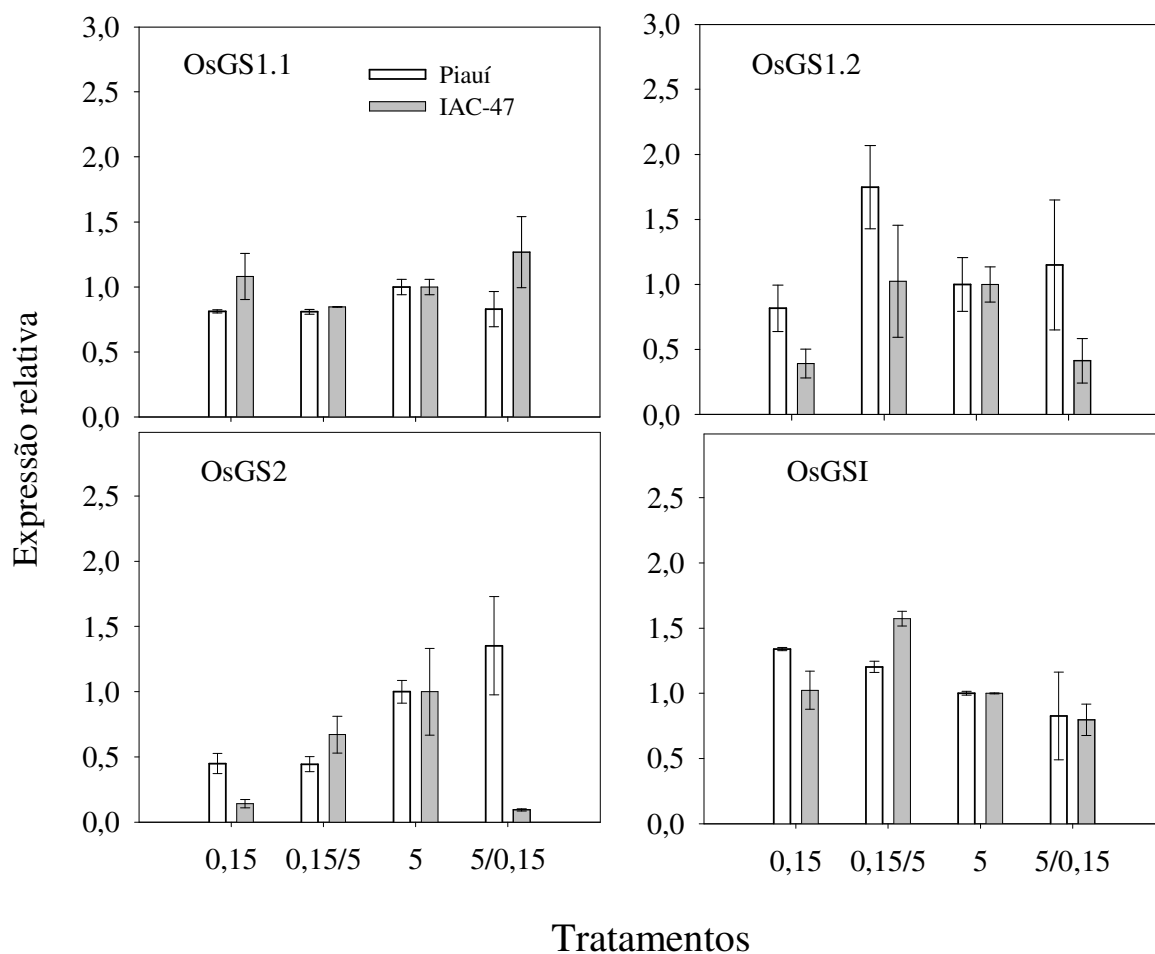


Figura 11. Expressão relativa dos genes que codificam para Glutamina Sintetase, isoformas GS1 (OsGS1.1; OsGS1.2) GS2 (OsGS2) e OsGSI, em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

É provável que as respostas sejam dependentes de como ocorre o metabolismo do N na planta ou mesmo os tecido onde ocorre, em função da espécie. Estudo em outras espécies, não leguminosas, tem mostrado efeito positivo do aumento da expressão de GS. Em plantas de arroz, a superexpressão simultânea das duas principais isoformas de GS (GS1.1 e GS2) aumentou a eficiência de uso de N. Segundo SUN et al., (2005) a massa fresca das plantas transformadas foi significativamente maior comparado às plantas selvagens quando cultivadas em meio MS com baixa concentração de N, na forma de NH_4^+ . Em fumo, a superexpressão de GS1 aumentou o crescimento das plantas sob baixa disponibilidade de N (ANDREA, et al. 2000). Em raízes de *Brássica napus* as expressão uma GS1 de soja foi observado um aumento na atividade de GS de 3 a 6 vezes que resultou em níveis reduzidos de NH_4^+ no tecido (DOWNS, et al. 1994).

A superexpressão dos genes *OsGSI.2* e *AtGLN1,2*, em plantas de arroz e *Arabidopsis*, respectivamente, causou um aumento do desenvolvimento de em condições de alto suprimento de NO_3^- , porém, sob baixo suprimento de N não houve diferenças entres as

plantas transformadas e normais (BRAUER et al., 2010; LOTHIER et al., 2011). A isoforma GLN1.2 auxilia na manutenção da concentração do NH_4^+ na célula, sob condições que favorecem o aumento dos teores deste íon (BRAUER et al., 2010). Dessa forma, a variedade Piauí parece se ajustar melhor a essa condição de aumento de rápido na disponibilidade de N, que pode resultar em aumento do teor de NH_4^+ e causar danos à célula.

Estudos têm mostrado que isoformas citossólicas de GS estão envolvidas na remobilização de N durante a senescência foliar e enfatizado um papel para esta enzima na produção de grãos, principalmente em plantas como arroz, milho e trigo (HIREL et al., 2001; TABUCHI et al., 2005; OBARA et al., 2002, SANTOS et al., 2007; SWARBRECK ET AL., 2011).

O controle de uma via metabólica pode ocorrer em vários níveis, sabe-se que a atividade de GS pode ser controlada a nível pós-traducional através de fosforilação e ligação de uma proteína 14-3-3 (MILLER et al., 2007; ORTEGA et al., 2006). A alteração na expressão de genes que codificam proteínas cinases e fosfatases em resposta a disponibilidade e NO_3^- foi verificado em arroz (LIAN et al., 2006), *Arabidopsis* (HO et al., 2009; WANG et al., 2000), tomate (WANG et al., 2001).

As expressões de duas isoformas de GOGAT dependentes de NADH, denominadas GLT1 e GLT2, são apresentadas na Figura 12. Assim como ocorre para GS a expressão das duas isoformas de NADH-GOGAT varia em função da disponibilidade de N, porém, em intensidades diferentes (Figura 11 e Figura 12). A expressão das GLT1 diminuiu com a redução no suprimento de N nas duas variedades, ocorrendo um leve aumento de expressão como o aumento no fornecimento de N na variedade IAC-47, assemelhando-se ao comportamento do gene *OsGS2* (Figura 11). A expressão da isoforma GLT2 diminuiu drasticamente nas plantas sob baixa disponibilidade de N, sendo quase indetectável. Da mesma forma, a redução do suprimento de N, de 5 para 0,15 mmol L^{-1} causa uma redução na expressão em 5 vezes na variedade IAC-47. Na variedade Piauí, houve uma grande variação da expressão entre as repetições, no tratamento em que foi feita a redução do suprimento de N.

A redução na expressão destas duas isoformas de GOGAT em resposta à redução no suprimento de N foi verificada por SHI et al., (2010). Estes autores não verificaram diferenças de expressão entre variedades, no entanto, foram observadas diferenças na atividade de NADH-GOGAT, assim como de GS, entre variedades. Em arroz a indução de NADH-GOGAT nas raízes foi observada após o fornecimento de 1 mmol L^{-1} de NH_4^+ (ISHIYAMA et al., 1998), ocorrendo o acúmulo da proteína principalmente na rizoderme e endoderme. Isso ocorre devido o amônio ser tóxico, não podendo ser transportado via simplásto, sendo necessário ser rapidamente assimilado. Em *Arabidopsis* a expressão de NADH-GOGAT nas raízes foi induzida por nitrato (WANG et al., 2000). Em *Arabidopsis*, a isoforma GLT1 é mais expressa nas raízes comparado às folhas (LANCIEN et al., 2003). Em arroz, a maior expressão das duas isoformas de NADH-GOGAT foi verificada nas raízes (ZHAO et al., 2006), porém, ao contrário do observado aqui, estes autores observaram um aumento da expressão sob condições limitantes de N. No entanto, não se sabe com certeza como isoformas de NADH-GOGAT podem estar envolvidas na assimilação do NH_4^+ proveniente da redução do NO_3^- nas raízes de arroz. A segunda etapa de redução do N nítrico ocorre nos plastídios, o que sugere que o NH_4^+ é assimilado através da GS2. A semelhança na expressão da isoforma GLT1 (Figura 12) com a expressão do gene *OsGS2* (Figura 11), sugere a participação desta enzima na assimilação do N proveniente do NO_3^- .

A nocaute da isoforma *OsGLT1* devido a inserção de um transposon *Tos17* causou uma redução nos teores de glutamato nas raízes de arroz semelhante tanto em plantas cultivadas em meio contendo 1 mmol L^{-1} NO_3^- ou 5 mmol L^{-1} de NH_4^+ (TAMURA et al., 2010). Segundo esses autores a isoforma GLT1 tem um papel essencial na assimilação de N

nas raízes de plantas de arroz, e a perda desta isoforma pode ser compensada por outras isoformas de GOGAT.

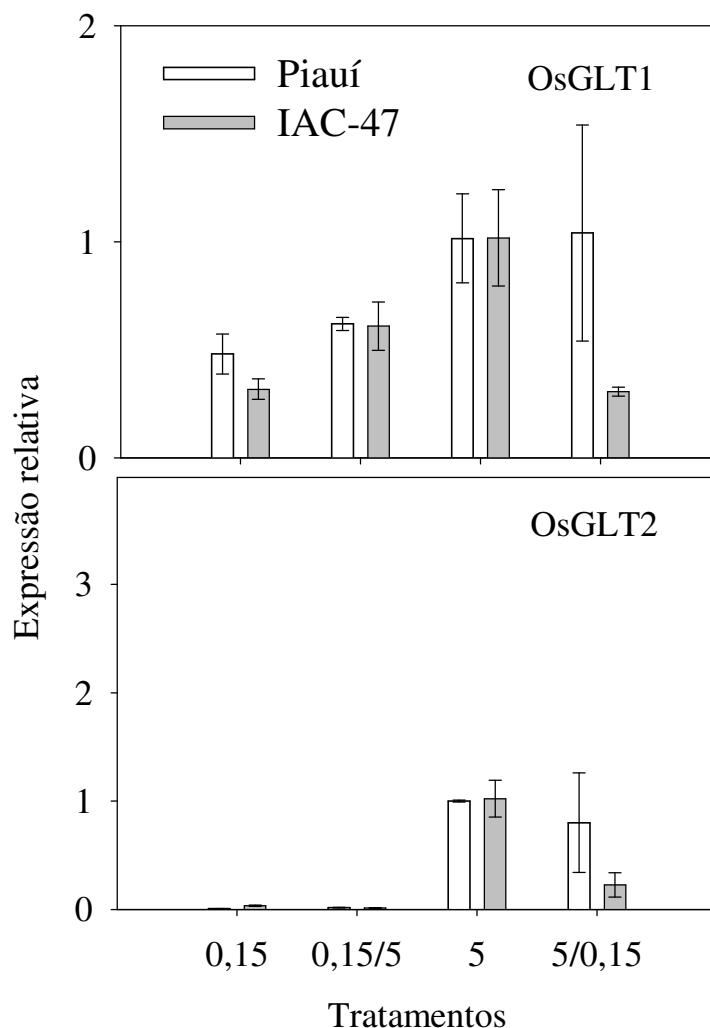


Figura 12. Expressão relativa dos genes que codificam para NADH-GOGAT, isoformas GLT1 e GLT2 em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

O suprimento constante de N, independente da concentração, não alterou a atividade das bombas de prótons da membrana plasmática e (H^+ -ATPase) (Figura 13). No entanto, o aumento rápido no suprimento de N causou redução na atividade, enquanto a redução no suprimento de N não resultou em um aumento significativo na atividade das bombas de prótons. Além disso, não houve diferenças entre variedades.

Resultados semelhantes a esses foram obtidos seis horas após o fornecimento de nitrato, sob alta e baixa concentração, as plantas de arroz previamente mantidas sem nitrogênio por 78 horas (SANTOS et al., 2009). No entanto, estes mesmos autores verificaram a restauração da atividade 24 horas após o fornecimento de NO_3^- . No trabalho de SANTOS et al. (2009) a retirada do N da solução causou um aumento significativo na atividade, associado

a um aumento no crescimento radicular. Segundo estes autores, a ausência de N na solução sinaliza para o aumento da atividade das bombas de prótons, promovendo a acidificação do apoplasto e promovendo assim o crescimento ácido. A redução da disponibilidade de nutrientes, assim com sua ausência, estimula o crescimento radicular (Figura 4) e poderia estimular a atividade das bombas de prótons, no entanto, a redução no suprimento de N por 24 horas não resultou em aumentos significativos na atividade destas enzimas (Figura 13).

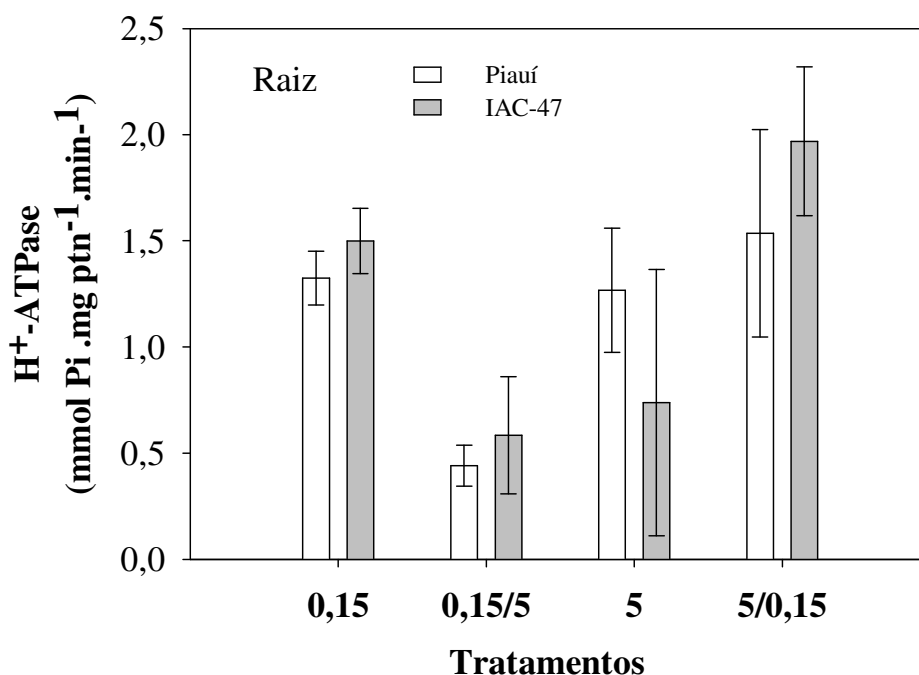


Figura 13. Atividade de P-H⁺-ATPase em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO₃⁻ L⁻¹. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO₃⁻ L⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO₃⁻ L⁻¹ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de NO₃⁻ L⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Em estudo utilizando plântulas de milho SANTI et al., (1995) observaram aumento da atividade das P-H⁺-ATPases após adição do N-NO₃⁻. Neste caso, estes autores usaram plântulas de milho com apenas três dias após a germinação, crescidas em solução contendo somente sulfato de cálcio na ausência de luz. Outro fato a ser considerado neste caso é a ausência de luz, que diminui bastante o processo de redução do NO₃⁻ 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 citossol retirando os prótons acumulados. No entanto, o aumento na atividade das bombas de prótons foi verificado após 3 horas de ressuprimento de N-NO₃⁻, em plantas mantidas sem N por 72 horas (SPERANDIO et al., 2011).

Foi avaliada a expressão de duas isoformas de P-H⁺-ATPases, OSA2 e OSA7 (Figura 14), que segundo resultados de SPERANDIO et al. (2011) apresentam elevada resposta ao ressuprimento de N dentre as 10 isoformas de P-H⁺-ATPases encontradas no genoma de arroz (BAXTER et al., 2003). Na variedade IAC-47, ocorre uma redução de 50% na expressão da isoforma OSA2 quando as plantas são cultivadas constantemente sob baixo suprimento de N ou quando ocorre a redução de 5 para 0,15 mmol L⁻¹ de N, enquanto o

aumento no suprimento causa uma pequena indução (Figura 14). A expressão da isoforma OSA2 na foi significativa na variedade Piauí. A isoforma OSA7 responde de forma diferente da OSA2 nas duas variedades (Figura 14).

A expressão da isoforma OSA7 é maior nas plantas cultivadas constantemente sob baixo suprimento de N. O aumento ou a redução no suprimento de N causa um pequeno aumento da expressão de OSA7 na variedade IAC-47, enquanto na variedade Piauí ocorre uma leve redução. As duas isoformas respondem aos tratamentos, porém de forma diferenciada. A expressão da isoforma OSA7 aumenta sob baixo suprimento de N, enquanto a isoforma OSA2 não responde ou apresenta uma leve redução. A maior expressão da isoforma OSA7 sugere que esta isoforma participa na absorção de N, sob baixas concentrações. Sob baixo suprimento de N, o gradiente químico entre o apoplasto e citossol torna-se maior, fazendo necessário o gasto de energia para aumento do gradiente eletroquímico utilizando o bombeamento de prótons realizado pelas P-H⁺-ATPases. A expressão de isoformas específicas pode alterar a composição de P-H⁺-ATPases na membrana, alterando as propriedades cinéticas, com afinidade por ATP ou capacidade de bombeamento de H⁺, levando à adaptação ao meio (ZHU et al., 2009; PALMGREN & CHRISTENSEN 1994).

Apesar da maior expressão da isoforma OSA7, a variação da atividade das bombas de prótons não se correlacionou com a variação na expressão (Figura 13 e Figura 14). Isso pode ser devido à atividade ser realizada em vesículas extraídas de toda a raiz, enquanto a absorção de nitrato ocorre principalmente nos pelos radiculares e próximo ao ápice radicular. Além disso, essas enzimas sofrem forte controle pós-traducional respondendo rapidamente às necessidades da célula (PALMGREN, 2001). No domínio C-terminal das P-H⁺-ATPases está localizada a região auto-inibitória da enzima, assim como outros sítios regulatórios. A ativação da enzima envolve uma fosforilação seguida da ligação de uma proteína 14-3-3 em um resíduo de treonina específico (DUBY et al., 2009). A análise das duas isoformas de H⁺-ATPases mais abundantes, PMA2 e PMA4, em *Nicotiana plumbaginifolia* foi verificado que apenas 44% (PMA2) e 32% (PMA4) das proteínas estavam ativas (BOBIK et al., 2010). Esse controle na atividade dessas enzimas foi observado ao adicionar fusicoccina à solução nutritiva, resultando em um aumento da acidificação da solução e aumento na absorção de K⁺ (BUCHER et al., 2006). A fusicoccina promove a ligação das proteínas 14-3-3 ao domínio regulador das H⁺-ATPases resultando em aumento de atividade (SZE & PALMGREN, 1999).

Os quatro genes dos transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade (NRT2) estudados apresentaram resposta aos tratamentos (Figura 15). A expressão dos genes *OsNRT2.1~2.3* foi maior nas raízes das plantas mantidas constantemente a 0,15 mM de NO₃⁻ comparado às plantas mantidas a 5 mM de NO₃⁻. A variação no fornecimento de NO₃⁻ causou respostas diferenciadas entre as variedades. Na variedade Piauí, o aumento do suprimento de NO₃⁻ de 0,15mM para 5 mM reduziu a expressão do gene *OsNRT2.1*, enquanto que, na variedade IAC-47 houve um grande aumento na expressão deste gene neste tratamento. A redução no fornecimento de NO₃⁻ de 5 mM para 0,15 mM causou um aumento da expressão do gene *OsNRT2.1* na variedade Piauí e uma redução na variedade IAC-47. A resposta do gene *OsNRT2.2* seguiu a mesma tendência do gene *OsNRT2.1* nas duas variedades, ao contrário de trabalhos anteriores (ARAKI & HASEGAWA, 2006; CAI et al., 2008). Os transportadores *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* possuem seqüências codificadoras iguais, diferindo nas extremidades 5' e 3' não traduzidas, porém, estudos anteriores mostraram padrões de expressão diferentes entre estes transportadores, em resposta ao fornecimento de N-NO₃⁻ (ARAKI & HASEGAWA, 2006; CAI et al., 2008). Isso mostra uma resposta totalmente oposta destes dois genes entre as variedades estudadas

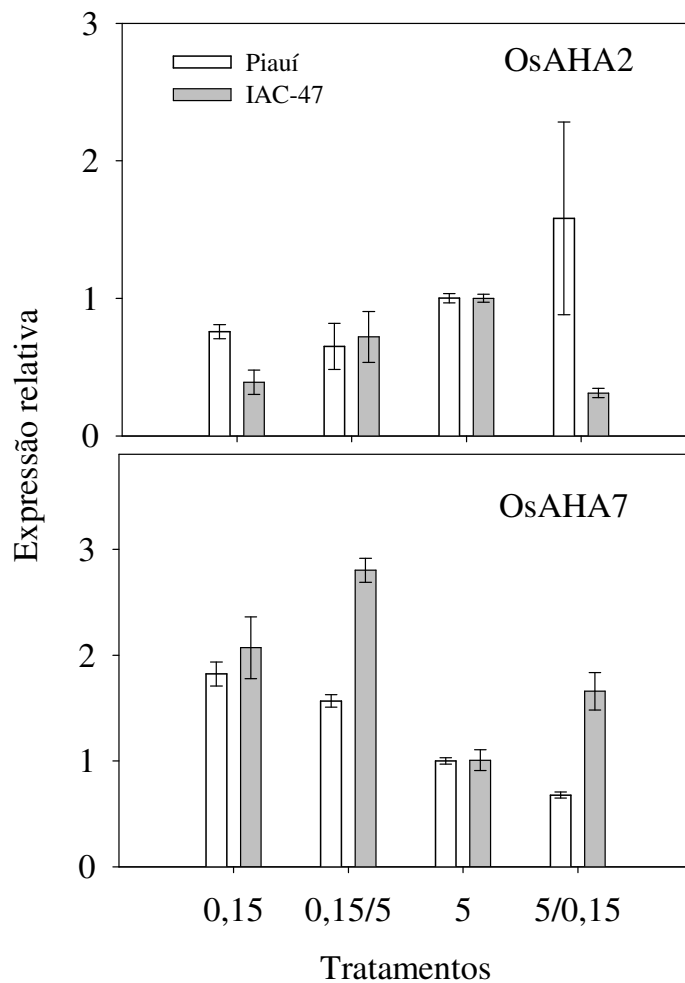


Figura 14. Expressão relativa dos genes que codificam para duas isoformas de P-H⁺-ATPase (OsOSA2 e OsOSA7) em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de NO₃⁻ L⁻¹. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de NO₃⁻ L⁻¹ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de NO₃⁻ L⁻¹ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de NO₃⁻ L⁻¹ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

O gene *OsNRT2.3* apresentou as mesmas respostas que o *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* na variedade Piauí, enquanto na variedade IAC-47 ocorre uma redução na expressão deste gene quando as plantas passam de alto para baixo suprimento de N. ARAKI & HASEGAWA (2006) identificaram quatro transportadores de nitrato no genoma de arroz. Um trabalho recente verificou que o mRNA do transportador *OsNRT2.3* sofre *splicing* alternativo, resultando em outra isoforma para este transportador, sendo as duas referidas como *OsNRT2.3a* e *OsNRT2.3b* (FENG et al., 2011). Os primers utilizados aqui são capazes de detectar a isoforma detectam o transportador *OsNRT2.3a*. Segundo FENG et al. (2011) o *OsNRT2.3a* apresenta um controle semelhante ao *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, sendo induzido por NO₃⁻ e reprimido por NH₄⁺, enquanto o *OsNRT2.3b* apresenta um nível de expressão estável independente do suprimento e forma de N. ARAKI & HASEGAWA (2006) não verificaram indução da expressão desse gene, provavelmente devido ao conjunto de primers utilizado.

O gene *OsNRT2.4* apresentou as maiores variações de expressão, sendo maior a expressão nas raízes das plantas sob baixo suprimento de N, comparado as plantas sob alto

suprimento. Além disso, a redução do fornecimento de NO_3^- de 5 mM para 0,15 mM causou uma grande indução na expressão, enquanto o aumento do suprimento causou uma grande repressão (Figura 15).

A expressão coordenada dos genes que codificam para transportadores é extremamente importante para aquisição de nutrientes. Na maioria dos casos, o ajustamento da aquisição de nutrientes pelas raízes, à demanda da planta, é difícil devido à baixa disponibilidade e a variação da concentração destes nutrientes na solução do solo. As plantas modificam o seu sistema de absorção alterando a capacidade de absorção e assim se adaptam à disponibilidade de nutrientes no solo (GOJON, et al., 2009). A variedade Piauí parece ajustar melhor a expressão dos genes em resposta a disponibilidades de N, ao contrário da IAC-47.

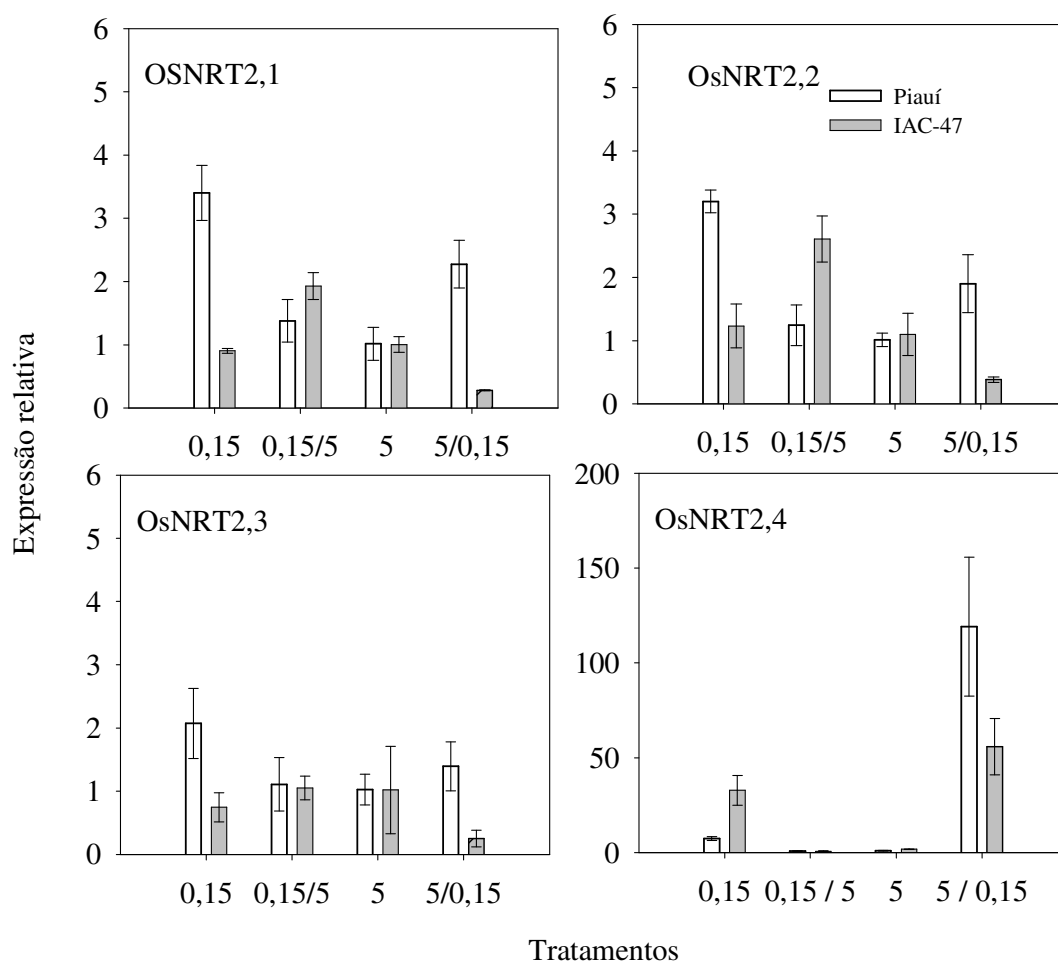


Figura 15. Expressão relativa de transportadores de nitrato de alta afinidade (NTR2) em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15-5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5-0,15) respectivamente.

Na maioria das espécies, a quantidade de nutrientes, como N, armazenados não é grande o suficiente para suportar o crescimento normal da planta, mesmo que por poucos dias, quando o nutriente não está disponível no meio (GOJON et al., 2009). As plantas podem utilizar duas estratégias para suportar tal situação, armazenar maiores quantidades do

nutriente em questão ou, utilizar de maneira mais eficiente os estoques internos de nutrientes. A variedade Piauí apresenta a capacidade de acumular quantidades de NO_3^- maiores que a variedade IAC-47 como observado na Figura 5, e em trabalhos anteriores (SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2007; SOUZA et al., 1998). Essa característica de acumular mais NO_3^- , criando um maior pool de reserva, pode conferir a variedade Piauí menor suscetibilidade às variações de disponibilidade de N no solo. Essa característica da variedade Piauí pode ser decorrente do aumento da expressão dos transportadores de alta afinidade em condições de baixa disponibilidade de N. Em *Arabidopsis*, a tolerância a períodos de privação de nitrogênio foi observada em linhagens que apresentavam maiores teores de nitrato no tecido no início do período de privação deste nutriente. Estas linhagens apresentavam maior expressão dos transportadores *AtNRT2.1*, *AtNRT2.4*, *AtNRT1.1* conferindo maior capacidade de absorção de NO_3^- (RICHARD-MOLARD et al., 2008).

Grande atenção tem sido dada ao transportador *AtNRT2.1* de *Arabidopsis*, que constitui o principal do sistema de transporte de alta afinidades (HATS) para absorção de NO_3^- (FILLEUR, et al., 2001; LI, et al., 2007). A transcrição do *AtNRT2.1* é estimulada por condições limitantes de N (GIRIN et al., 2007) e estudos tem mostrado que a perda deste transportador impede o aumento da absorção de nitrato através do sistema de alta afinidade, em resposta à deficiência de N (CEREZO et al., 2001). No entanto, ainda não está claro se o aumento da absorção de NO_3^- através do sistema de alta afinidade desencadeado pela deficiência de N, é predominantemente devido ao aumento da transcrição do *AtNRT2.1* (GOJON et al., 2009). Além disso, há evidências de que os transportadores NRT2 são também regulados pós-traducionalmente em várias espécies de plantas (NAVARRO et al., 2008; FRAISIER et al., 2000; WIRTH et al., 2007). Em *Arabidopsis* foi verificado que o aumento na transcrição não resulta em aumento proporcional na quantidade de transportadores na membrana plasmática, permanecendo estável por períodos curtos de indução e repressão (WIRTH et al., 2007).

Além da concentração de N no solo ser geralmente baixa, esta pode flutuar com o tempo e no espaço, dependendo de uma série de fatores (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2010). A absorção de nitrato através das raízes ocorre através de dois sistemas de absorção que coexistem nas raízes e atuam de forma coordenada para obter o NO_3^- da solução do solo (TSAY et al., 2007). De acordo com a resposta ao nitrato, estes transportadores podem ser classificados como constitutivos, induzidos ou reprimidos por nitrato (OKAMOTO et al., 2003). Em arroz, são conhecidos quatro transportadores de NO_3^- de alta afinidade, *OsNRT2.1~2.4*, que apesar de serem poucos, comparado a *Arabidopsis* que possui sete, a resposta e as funções destes genes ainda não foram bem estudadas.

Muitos genes envolvidos no controle mediado por NO_3^- sobre os transportadores de nitrato têm sido identificados em *Arabidopsis*. O *NTR1.1*, um transportador de dupla afinidade (LIU et al., 2003), foi um dos primeiros genes identificados que exerce controle sobre o *NRT2.1* (MUÑOS et al., 2004). Em plantas de *Arabidopsis* foi demonstrado que este controle ocorre devido a um sinal específico do NO_3^- dependente do *NRT1.1*, causando uma repressão na expressão do *NRT2.1*.

Além da expressão dos transportadores NRT2, foi avaliada a expressão de proteínas NAR nas raízes das plantas (Figura 16). A funcionalidade do sistema da absorção de alta afinidade requer a expressão de proteínas reguladoras NAR2, que em conjunto com o NRT2, forma o complexo protéico NRT3. Tanto em *Arabidopsis* como em arroz foram encontradas duas isoformas de proteínas NAR: *NAR2.1* e *NAR2.2* (OKAMOTO et al., 2006; ARAKI & HASEGAWA, 2006).

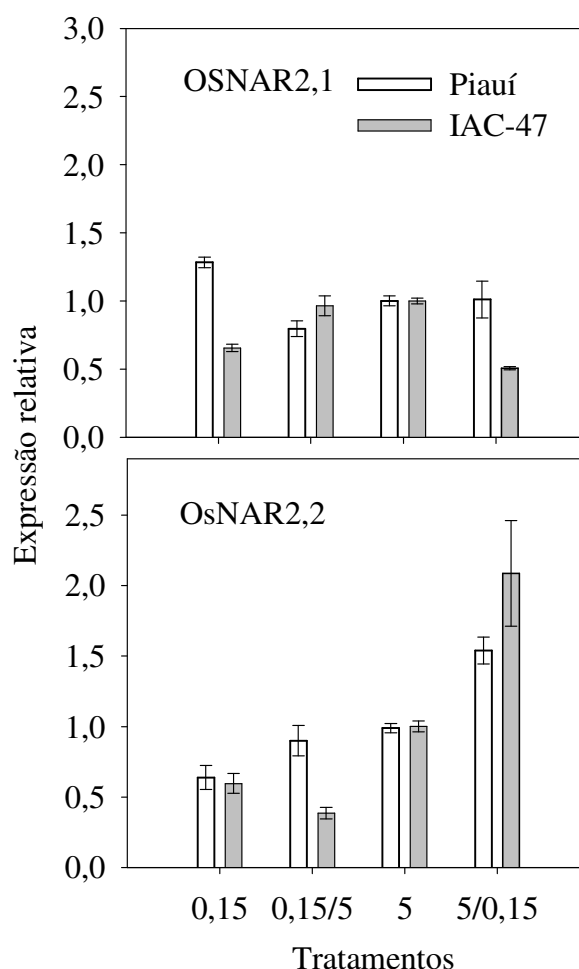


Figura 16. Expressão relativa de genes que codificam para proteínas NAR2.1 e NAR2.2 em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15-5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Na variedade Piauí, a expressão dos genes *OsNAR2.1* sob baixo suprimento de N foi ligeiramente maior do que sob alto suprimento de N (Figura 16), ao contrário do que se observa na variedade IAC-47, na qual se observa uma expressão quase 50% mais baixa nas plantas sob baixo suprimento de N. Isso indica que a variedade Piauí mantém o sistema de absorção de alta afinidade mais ativo sob essas condições.

As proteínas NAR têm um papel fundamental no endereçamento dos transportadores NRT2. Em plantas mutantes *nar2.1* de *Arabidopsis*, devido a inserção de um T-DNA, não foi possível detectar o transportador NRT2.1 na membrana plasmática, apesar da expressão e tradução do NRT2.1 ter sido confirmada (WIRTH et al., 2007).

Estudos recentes têm sugerido que a unidade funcional do sistema de alta afinidade consiste de um tetrâmero de duas unidades de NRT2.1 e duas unidades de NAR2.1 (YONG et al., 2010). Esta hipótese é apoiada pelo fato de que plantas de *Arabidopsis* deficientes em proteínas NAR tem o crescimento extremamente reduzido sob baixa concentração de nitrato e apresentam apenas 5% da capacidade de absorção de N-NO_3^- através do sistema de alta

afinidade (OKAMOTO et al., 2006; ORSEL et al., 2006), enquanto a perda do gene *AtNRT2.1* causa uma redução de 70% (LI et al., 2007). As respostas do gene *OsNAR2.1* seguem um padrão semelhante ao que ocorre para os transportadores *OsNRT2* (Figura 15), sugerindo um melhor controle do sistema de alta afinidade nesta variedade.

A expressão do *OsNAR2.2* é diferente da expressão dos genes dos transportadores *OsNRT2.1~2.3*. Para *OsNAR2.2* ocorre uma redução na expressão sob baixo suprimento de N, e um aumento quando ocorre a redução de 5 para 0,15 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻. No genoma de *Arabidopsis* foram encontrados os dois genes NAR, no entanto, o gene *AtNAR2.2*, ao contrário do gene *AtNAR2.1*, não foi encontrado em bancos de dados de expressão gênica de *Arabidopsis* (OKAMOTO et al., 2006). Porém, em arroz, a expressão deste gene foi detectada (ARAKI & HASEGAWA, 2006; TAKAYANAGI et al., 2010; FENG et al., 2011). FENG et al. (2011) realizaram ensaios para verificar a funcionalidade dos transportadores, utilizando oocitos de *Xenopus*. Apenas quando foram injetados ambos RNAs, do *OsNAR2.1* e do *NRT2* que houve transporte de NO₃⁻. A injeção de RNA do *NAR2.1* ou *NRT2* sozinho não resultou em transporte de NO₃⁻. Apenas o *NAR2.1* foi capaz de interagir com os transportadores *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2*, *OsNRT2.3a* promovendo o transporte de N-NO₃⁻. Os transportadores *OsNRT2.3b* e *OsNRT2.4* transportaram N-NO₃⁻ independente da interação com *NAR2.1*. Estes autores não verificaram contribuição do *NAR2.2* na absorção de N-NO₃⁻.

As respostas dos transportadores de nitrato nas folhas (Figura 17) foi diferente do observado nas raízes. Na variedade Piauí, os genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.3* foram mais expressos nas plantas sob alto fornecimento de NO₃⁻ enquanto na variedade IAC-47 este tratamento apresentou a menor expressão (Figura 17). O gene *OsNRT2.2* apresentou um aumento de expressão quando as plantas sob 5 mM de NO₃⁻ passaram a receber 0,15 mM de NO₃⁻. A resposta do gene *OsNRT2.4* foi diferente da resposta observada nas raízes. Na variedade Piauí a maior expressão foi verificada sob alto suprimento de NO₃⁻ e na variedade IAC-47, a maior expressão ocorreu nas plantas que passaram de um suprimento para um baixo suprimento de NO₃⁻.

A expressão dos transportadores *OsNRT2* ocorrem tanto nas raízes (Figura 15) como nas folhas (Figura 17). Estudos iniciais mostraram que os mRNAs *NRT2.1* acumularam principalmente nas raízes de *N. plumbaginifolia* (QUESADA et al., 1997) e *Arabidopsis thaliana* (ZHUO et al., 1999). Em *Arabidopsis*, os genes *NRT2.4*, *NRT2.5* e *NRT2.6* são preferencialmente expressos nas raízes, enquanto *NRT2.3* foi expresso tanto nas raízes quanto na parte aérea e *NRT2.7* apenas na parte aérea (ORSEL et al., 2002).

FENG et al. (2011) verificaram a expressão destes transportadores em diferentes tecidos de arroz. Os transportadores *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* são expressos em todos os tecidos nas raízes primárias e laterais, sendo o *OsNRT2.1* e *OsNAR2.1* mais abundantes na rizoderme e nas pontas das raízes. Os transportadores *OsNRT2.3* foram mais expressos no cilindro central das raízes primárias e laterais e o *OsNRT2.4* foi mais expresso na base do primórdio radicular. Esses autores verificaram maior expressão do *OsNRT2.3b* nas raízes e *OsNRT2.3a* nas folhas. Estes transportadores apresentam expressão tecido específica, o que sugere que possuem funções específicas (FENG et al., 2010). A elevada expressão do *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* e *OsNAR2.1* mostra que estes estão principalmente envolvidos no sistema de absorção de NO₃⁻ do meio externo. Por outro lado, o transportador *OsNRT2.3* por ser mais expresso no cilindro central da raiz e nas folhas, pode estar envolvido no transporte interno NO₃⁻.

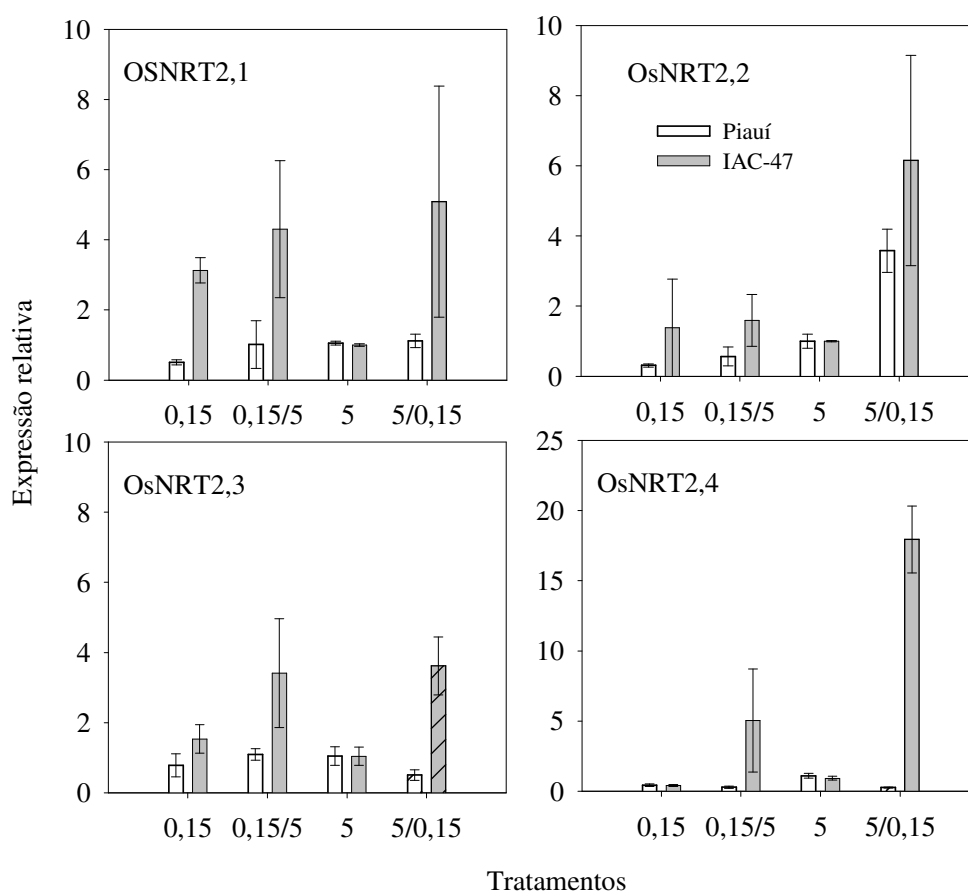


Figura 17. Expressão relativa de transportadores de nitrato de alta afinidade (OsNTR2) em folhas de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15-5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5-0,15) respectivamente.

O padrão de expressão relativa dos genes dos transportadores de nitrato de baixa afinidade (*NRT1*) foi modificado pelos tratamentos (Figura 18), assim como os transportadores de alta afinidade (NRT2). Os genes *OsNRT1.1*, *OsNRT1.2*, *OsNRT1.3* e *OsNRT1.4* apresentaram respostas diferenciadas. Sob baixo suprimento de NO_3^- foi observado maior expressão dos genes *OsNRT1.2*, *OsNRT1.3* e *OsNRT1.4* na variedade Piauí, comparado à variedade IAC-47.

A mudança no suprimento de 0,15 para 5 mM de NO_3^- causou uma redução de expressão dos genes *OsNRT1.3*, *OsNRT1.4*, e *OsNRT1.2* na variedade IAC-47. Em *Arabidopsis* foram identificados e caracterizados 9 transportadores de NO_3^- da família NRT1. Esta família possui genes induzidos e constitutivos, que apresentam funções diferenciadas envolvendo desde transporte de NO_3^- até mecanismos de sinalização (DECHORGNAT et al., 2011). Os transportadores de baixa afinidade são induzidos sob altas concentrações de nitrato no meio externo (MASCLAUX-DRAUBRESSE et al., 2010). No entanto, verificamos elevada expressão no gene *OsNRT1.2* sob baixo suprimento de N na variedade Piauí. Comparado a *Arabidopsis* pouco se sabe sobre as características dos transportadores de baixa afinidade de arroz. Em arroz, apenas dois genes desta família foram clonados, *OsNRT1.1* (LIN et al., 2000) e *OsNRT1.3* (HU et al., 2006), no entanto não foram completamente caracterizados. O transportador OsNRT1.1, apesar de ter sido identificado através da

homologia de seqüência com o transportador *AtNRT1.1* de *Arabidopsis*, não parece ser o ortólogo deste último (DECHORGNAT et al.,2011), além de apresentar maior semelhança funciona com o *AtNRT1.2* (HU et al., 2006). Segundo HU et al. (2006), o transportador *OsNRT1.3* apresenta maior homologia ao *AtNRT1.1* de *Arabidopsis*. A expressão do *AtNRT1.1* é induzida por NO_3^- tanto sob alto como sob baixo suprimento deste íon (HO et al., 2009) e participa dos dois sistemas de absorção (HATS e LATS). A resposta do transportador *OsNRT1.2* merece atenção, pois devido essa homologia funcional, é possível que esse transportador esteja contribuindo para o sistema de alta afinidade em arroz.

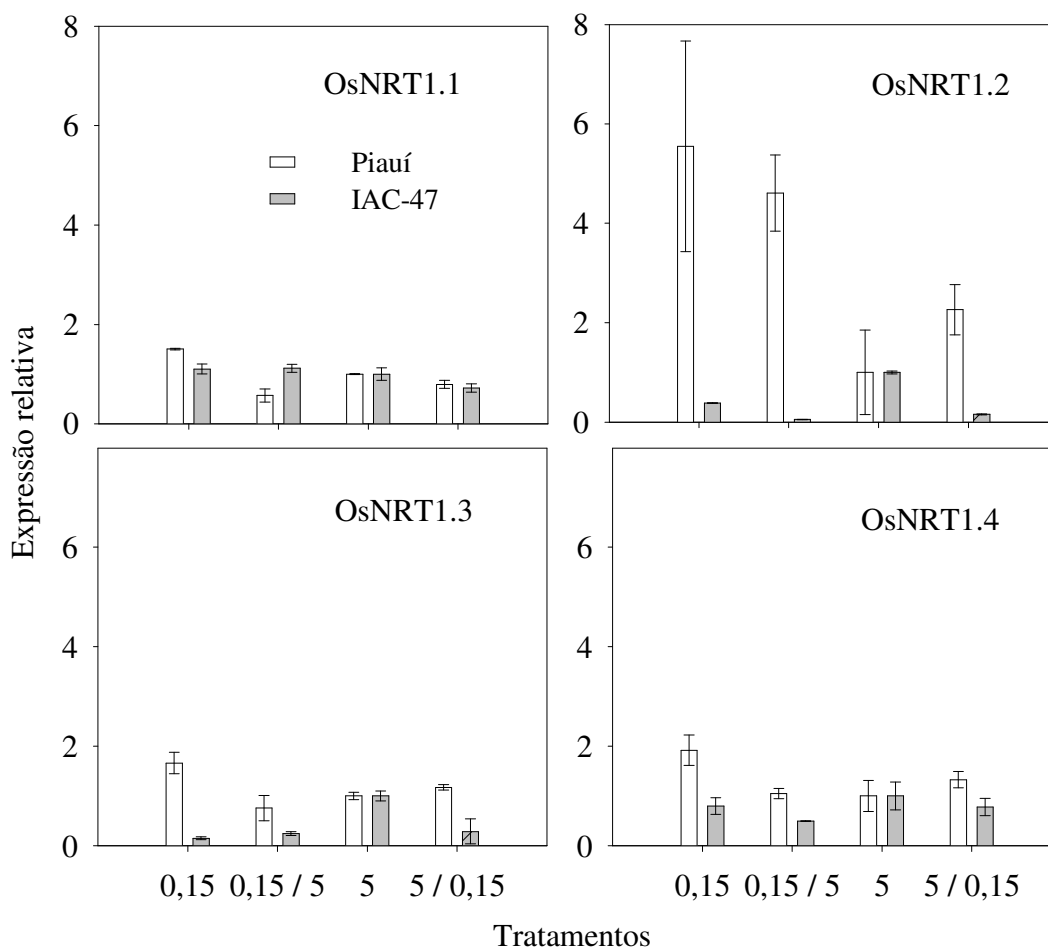


Figura 18. Expressão relativa de transportadores de nitrato de baixa afinidade (OsNTR1) em raízes de plantas de arroz, variedade Piauí (P) e IAC47 (I), cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por duas horas (0,15/5) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ por 24 horas (5/0,15) respectivamente.

Nas folhas, houve menor efeito do suprimento de N sobre a expressão dos transportadores de baixa afinidade (Figura 19) quando comparado com a expressão nas raízes. As maiores diferenças entre as variedades foram observadas para os transportadores *OsNRT1.2* e *OsNRT1.3*. O transportador *OsNRT1.3* foi mais expresso na variedade Piauí cultivada constantemente sob alto fornecimento de N (Figura 19).

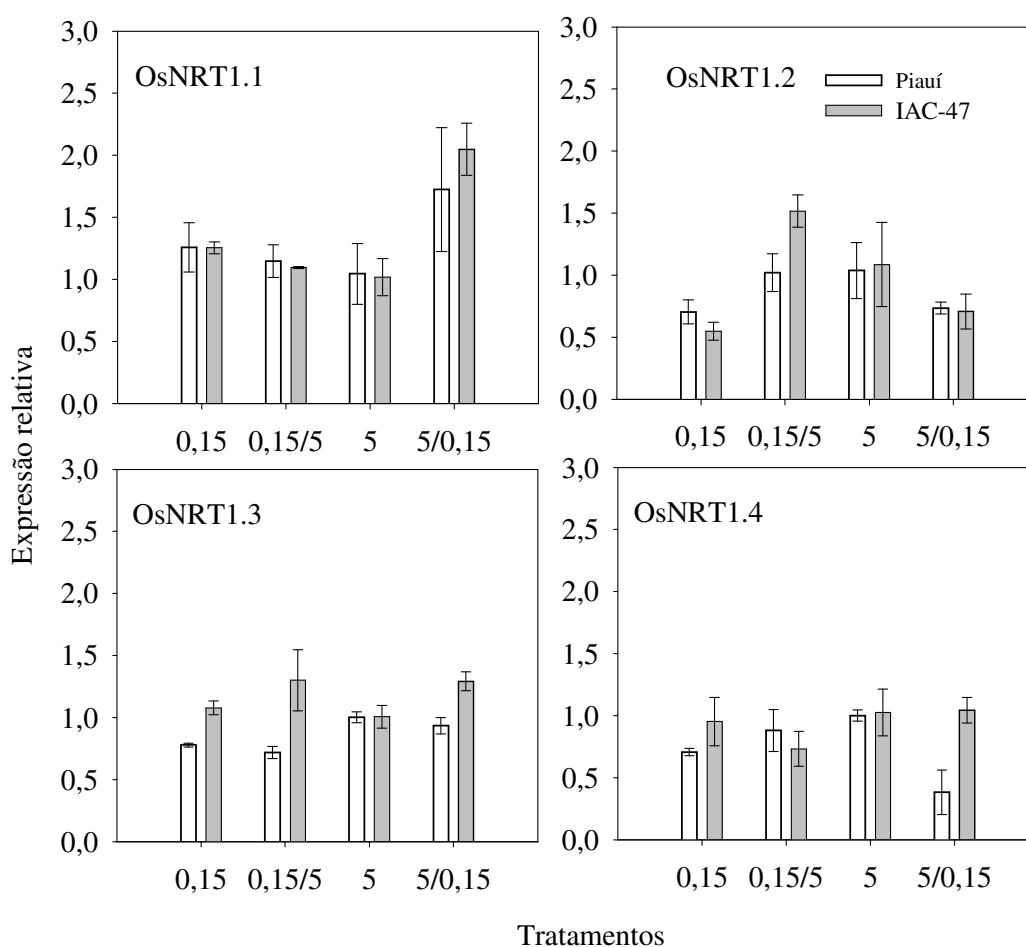


Figura 19. Expressão relativa de transportadores de nitrato de baixa afinidade (OsNTR1) em folhas de plantas de arroz, variedade Piauí e IAC47, cultivadas em solução nutritiva contendo 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$. Dois grupos de plantas cultivadas em 0,15 e 5,0 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ foram transferidas para soluções contendo 5 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ (por duas horas) e 0,15 mmol de $\text{NO}_3^- \text{L}^{-1}$ (por 24 horas) respectivamente.

A variedade Piauí desenvolveu estratégias que lhe permitisse tolerar situações limitantes de fornecimento de nutrientes no solo. Com os resultados obtidos, verificamos que esta variedade apresenta um metabolismo diferente da variedade melhorada. A variedade Piauí possui um sistema de absorção mais eficiente, que responde mais rápido ao aparecimento de N no meio externo, além de possuir um sistema de absorção mais eficiente, apresentando uma maior afinidade pelo nitrato (SANTOS et al., 2009). Outra característica importante desta variedade é a eficiência fisiológica de uso do N, em que há uma remobilização mais lenta do NO_3^- armazenado nos tecidos, uma vez que este se encontra em baixa disponibilidade. Essa remobilização mais lenta do NO_3^- parece estar relacionada de alguma maneira com a remobilização do N já reduzido (remobilização), na forma de proteínas ou amino ácidos. O que nos leva a esta hipótese são os teores de amino ácidos nos tecidos da variedade Piauí e a atividade da GS que é uma enzima que está envolvida no controle do uso de N nas plantas.

4.2 Expressão Gênica de Glutamina Sintetase e Transportadores de Nitrato em Resposta ao Ressuprimento de Nitrato na Solução Nutritiva (Experimento II)

A massa fresca das plantas não variou durante o experimento, provavelmente devido ao curto período de tempo entre as coletas (Tabela 4). Da mesma forma, os valores de massa fresca não foram afetados pelos diferentes níveis de nitrogênio. Por outro lado, a variedade IAC-47 apresentou um acúmulo de massa fresca maior que a variedade Piauí. O menor acúmulo de massa na variedade Piauí pode ter sido devido ao período em que as plantas permaneceram sem N, onde a IAC-47 remobiliza o NO_3^- rapidamente, enquanto a Piauí controla mais a remobilização (SANTOS et al., 2009). No entanto, o acúmulo de massa no estágio de plântula não afeta o acúmulo de massa ou a produção de grãos no final do ciclo (Bi et al., 2010). Deve-se lembrar que a produção de massa e grãos por estas variedades foi anteriormente estudada (SOUZA et al., 1998). No final do período de desenvolvimento vegetativo a variedade Piauí apresenta um maior acúmulo de massa quando comparada a variedade IAC-47, mesmo quando cultivada em vasos com terra (SOUZA et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004) ou solução nutritiva (SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2009a).

Tabela 4. Massa fresca de plantas de arroz após ressuprimento com N-NO_3^- (0,15 e 5 mmol L^{-1}) por 6 e 24 horas, após permanecer por 72 h em solução sem N.

	Sem Nitrogênio		0,15 mM NO_3^-		5,00 mM NO_3^-	
	IAC 47	Piauí	IAC 47	Piauí	IAC 47	Piauí
	g. vaso ⁻¹					
Raiz	3,27 ±0,25*	2,76 ±0,21	3,24 ±0,24	2,68 ±0,15	3,11 ±0,15	2,53 ±0,08
Folha	7,34 ±0,36	5,96 ±0,23	7,26 ±0,32	5,71 ±0,19	7,00 ±0,18	5,51 ±0,09

* Médias de três vasos, com 4 plantas cada vaso, ± desvio padrão da média

Após um período de 3 dias de cultivo sem nitrogênio o conteúdo de NO_3^- nas raízes das plantas de arroz foi significativamente alterado (Figura 20 A e B). Estes resultados estão de acordo com os resultados observados no primeiro experimento (Figura 5), onde se observa uma redução nos teores de NO_3^- nas raízes das plantas que receberam baixo suprimento de N por 24 horas, no entanto, devido ao longo período sem N, a queda nos teores foi muito maior. Como pode ser visto nas plantas que permaneceram sem N, os teores de NO_3^- foram drasticamente reduzidos, não sendo detectado nas raízes da variedade Piauí e apenas no tempo de 6 horas nas raízes da variedade IAC-47 (Figura 20B). Já nas folhas observa maiores teores de nitrato tanto nas plantas sobre deficiência quanto no ressuprimento com 0,15 ou 5mM de N-NO_3^- (Figura 20A).

Esses resultados indicam que a variedade Piauí, além de acumular mais NO_3^- , utiliza esse NO_3^- de forma mais econômica durante a deficiência, permitindo sempre a existência de um *pool* de reserva. Esse comportamento parece resultar numa estratégia para maior eficiência de uso do N. O NO_3^- é um íon muito móvel no solo e o pouco que é produzido pela mineralização da matéria orgânica é disputado entre as plantas e os microorganismos, fazendo com que fique escasso na solução do solo. Assim, utilizar o NO_3^- acumulado de forma mais eficiente pode favorecer as plantas, permitindo tolerar melhor o período de déficit deste nutriente. Em *Arabidopsis* foi demonstrado que uma linhagem que acumulava maiores teores de NO_3^- conseguia sustentar o crescimento normal por um maior tempo de ausência de N no meio (RICHARD-MOLARD, et al., 2008).

O ressuprimento de NO_3^- causou um grande aumento nos teores de NO_3^- nos tecidos das plantas, tanto a 0,15 como a 5 mM, atingindo valores máximos nas raízes após 24 horas

(Figura 20A e B). Os teores nas folhas da variedade Piauí superiores aos da variedade IAC47, nas duas doses de NO_3^- (Figura 20 A). Sob baixo fornecimento de NO_3^- , a variedade Piauí apresentou maiores teores de NO_3^- nas folhas (Figura 20A) quando comparada a variedade IAC-47, 6 horas após o ressuprimento. Ao contrário do observado sob alto fornecimento, no ressuprimento com 0.15 mmol L^{-1} de N-NO_3^- , houve uma grande queda nos teores de NO_3^- após 24 horas. Isso ocorre principalmente nas folhas, e é devido provavelmente à exaustão do NO_3^- na solução, que resulta na redução do influxo e queda dos níveis internos devido a assimilação.. Depois de 24h do ressuprimento com 0.15 mmol L^{-1} , a variedade Piauí mantém teor mais elevado de N-NO_3^- nas folhas que a IAC-47 (Figura 20A), mostrando mais uma vez a maior capacidade de manter o conteúdo interno de NO_3^- .

O transporte de NO_3^- para o interior dos vacúolos e a manutenção de concentrações elevadas deste ânion necessita de um transporte ativo através do tonoplasto (MILLER & SMITH, 1996). Este mecanismo foi elucidado quando foi descoberto um transportador, da família dos transportadores de Cl^- , AtCLC, capaz de transportar NO_3^- , por meio de um antiporte com prótons (ANGELI et al., 2006). No entanto, é necessário um transporte de prótons para o interior dos vacúolos, mediado por uma V-H^+ -ATPase e/ou H^+ -PPase, para gerar um potencial de membrana que permita a entrada do NO_3^- (KREBS et al., 2010). O maior acúmulo de NO_3^- na variedade Piauí está de acordo com trabalhos anteriores (SOUZA et al., 1998; SANTOS et al., 2009b; SANTOS et al., 2009a). Estudando o metabolismo de NO_3^- na variedade Piauí e na variedade IAC-47, foi verificado uma maior atividade de V-H^+ -ATPase nas bainhas (SANTOS, 2006) e raízes (GARRIDO et al., 2009) da variedade Piauí quando comparada à variedade IAC-47, mostrando o maior potencial da variedade Piauí de acumular nitrato.

HIREL et al. (2001) sugerem que plantas de milho selecionadas para uma elevada eficiência no uso de N, devem 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 deveriam ter uma baixa atividade da NR, o que favoreceria o acúmulo de NO_3^- que poderia ser usado no final do ciclo para a produção de grãos.

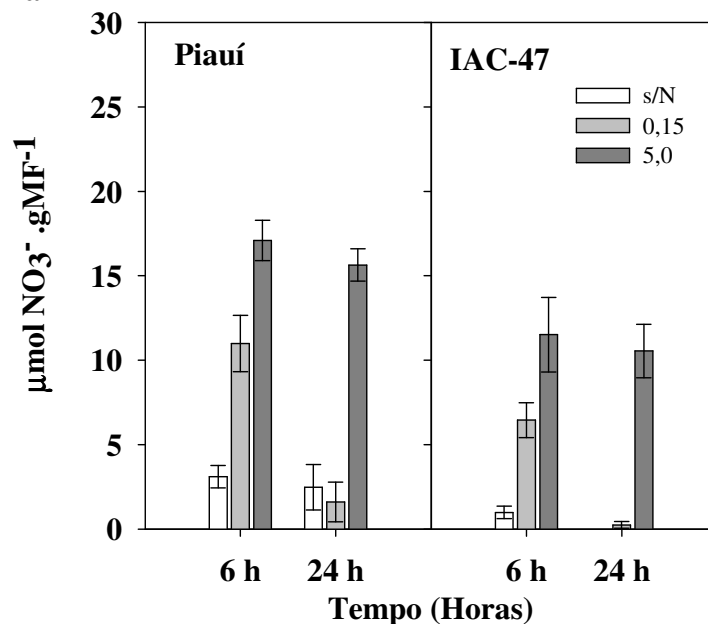
RODRIGUES et al. (2004) trabalhando com duas variedades de arroz, uma tradicional (Piauí) e outra melhorada (IAC-47), verificaram que a variedade Piauí apresentou uma elevada eficiência no uso de N quando comparada com a IAC-47. Estes autores atribuíram o fato à elevada capacidade que a variedade Piauí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

A eficiência para absorção de N em estágios iniciais de desenvolvimento na cultura do arroz pode ser resultado de um processo adaptativo dessas plantas a ambientes onde a disponibilidade desse nutriente é baixa e ocorre transitoriamente como “fluxos” nas épocas de chuva. O maior acúmulo de N-NO_3^- na variedade Piauí, sob diversas condições ambientais e diferentes estágios de desenvolvimento já havia sido demonstrado em outros estudos (RODRIGUES et al., 2004; SOUZA e FERNANDES, 2006; SANTOS et al., 2009b), demonstrando seu potencial no acúmulo e uso eficiente de N. O acúmulo de NO_3^- nos vacúolos nos primeiros estágios de desenvolvimento e a sua remobilização posterior têm sido considerados como bons indicadores da capacidade de produção de grão em milho (HIREL et al., 2001).

Os teores de aminoácidos livres nos tecidos seguiu o mesmo padrão que os teores de NO_3^- (Figura 21). No entanto, ao contrário do observado para NO_3^- , os teores de N-amino foram muito maiores nas folhas que nas raízes (Figura 21A). Diferente dos teores de NO_3^- , não houve diferenças nos teores de aminoácidos livres entre as plantas mantidas sem NO_3^- .

Nas raízes, os teores de aminoácidos livres foram aproximadamente 5 vezes menores que os encontrados nas folhas, e não foi observado diferenças entre variedades (Figura 21B).

(A) Folha



(B) Raiz

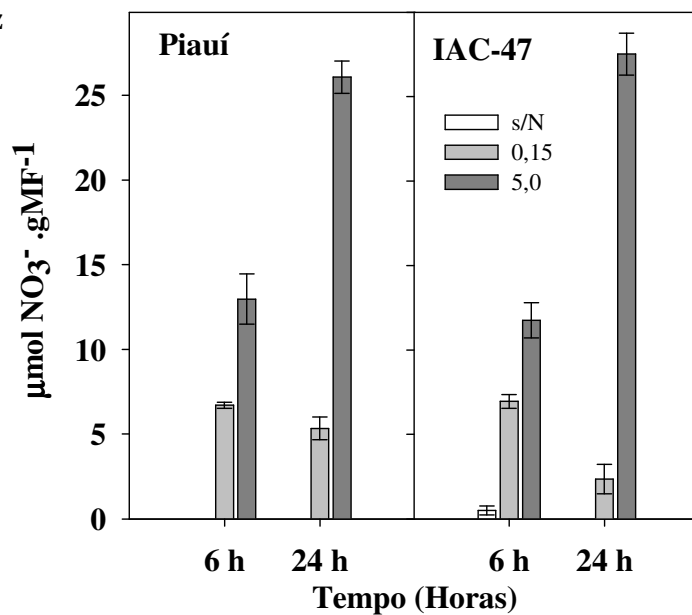


Figura 20. Teores de N-NO₃⁻ em folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e após com 0,15 e 5 mmol L⁻¹ de NO₃⁻.

Comparando o perfil de expressão gênica em raízes de plantas de arroz cultivadas sob baixo e alto suprimento de N, foi verificado um aumento na expressão do gene *OsENOD93.1* (um gene envolvido no processo de nodulação em leguminosas) nas raízes das plantas sob baixo suprimento de N (BI et al., 2009). A superexpressão do gene *OsNOD93-1* resultou no aumento da eficiência do uso de N nas plantas de arroz. Uma das modificações observadas nas plantas transformadas foi o aumento nos teores de N-amino na seiva do xilema,

principalmente sobre condições limitantes de N. Resultados semelhantes foram verificados em plantas de arroz em que a superexpressão do gene *OscIPK12* resultou no aumento da EUN, quando cultivadas sob baixa disponibilidade de NH_4^+ (ASANO et al., 2010). Plantas de arroz superexpressando uma aspartato amino transferase (AAT) tiveram maiores teores de N-amino nos tecidos e maior acúmulo de proteínas no grão, quando comparado com as plantas selvagens (ZHOU et al., 2009).

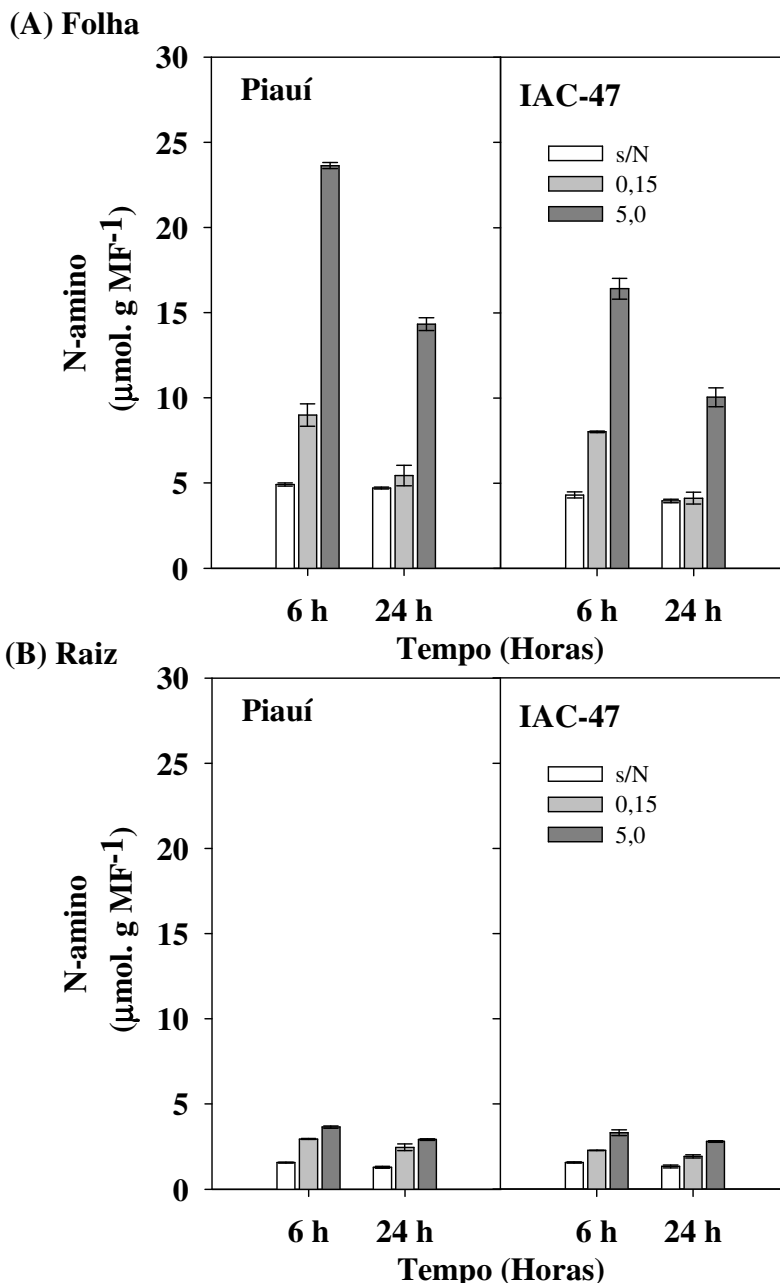
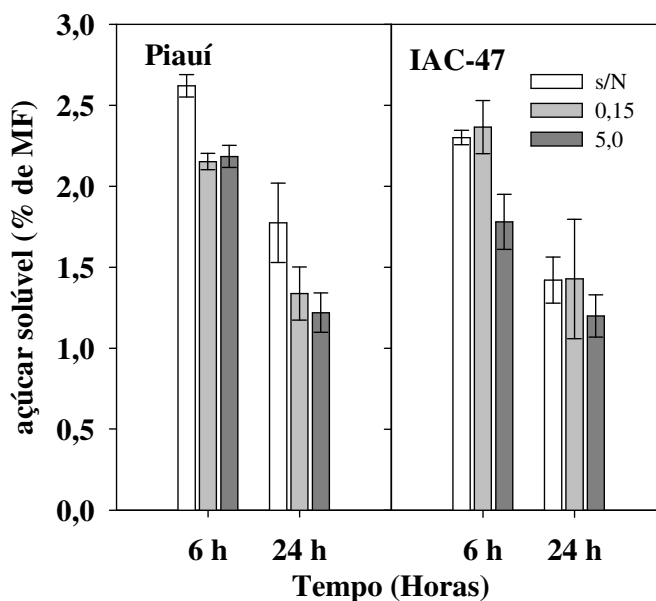


Figura 21. Teores de amino ácidos livres em folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e após com 0,15 e 5 mmol L^{-1} de NO_3^- .

Houve redução nos teores de açúcares solúveis nas raízes das plantas quando sob alto suprimento de NO_3^- (Figura 22). Nas folhas, a redução nos teores de açúcares da variedade Piauí foi observada sob alto e baixo suprimento de NO_3^- , enquanto na variedade IAC-47 esta

queda só foi observada 6 horas após o ressuprimento com 5 mM NO_3^- (Figura 22). Independente dos tratamentos, os teores de açúcares solúveis foram menores no tempo de 24 horas que as 6h (Figura 22). Isso ocorreu provavelmente devido ao tempo de luz acesa antes das coletas, que para 6 horas após o ressuprimento corresponde a 9 horas após acenderem as luzes da câmara de crescimento, enquanto que 24 horas após o ressuprimento corresponde a 3 horas após as luzes ascenderem. A redução nos teores de açúcares nas folhas (Figura 22) ocorre ao mesmo tempo em que aumenta os teores de N-amino (Figura 21). Esse resultado se deve, em parte, pela utilização destes açúcares como fonte de esqueletos de C e energia para assimilação de N (FERNANDES, 1991).

(A) Folha



(B) Raiz

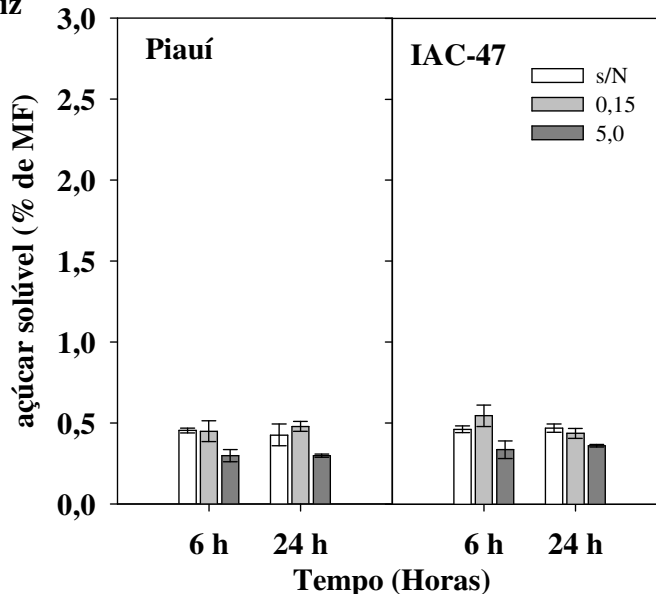


Figura 22. Teores de açúcares solúveis em folhas (A) e raízes (B) de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após tratamento sem nitrogênio e após com 0,15 e 5 mmol L^{-1} de NO_3^- .

Não houve diferenças significativas na atividade de glutamina sintetase entre as variedades (Figura 23), independente do suprimento de N. O ressuprimento com NO_3^- causou um aumento significativo na atividade de GS, principalmente nas raízes. Nas folhas a atividade de GS só é alterada 24 horas após o ressuprimento de 5mmol L^{-1} de NO_3^- . Nas raízes o aumento na atividade de GS ocorre mais rápido comparado às folhas, apresentando aumento de atividade 6 horas após o ressuprimento de NO_3^- .

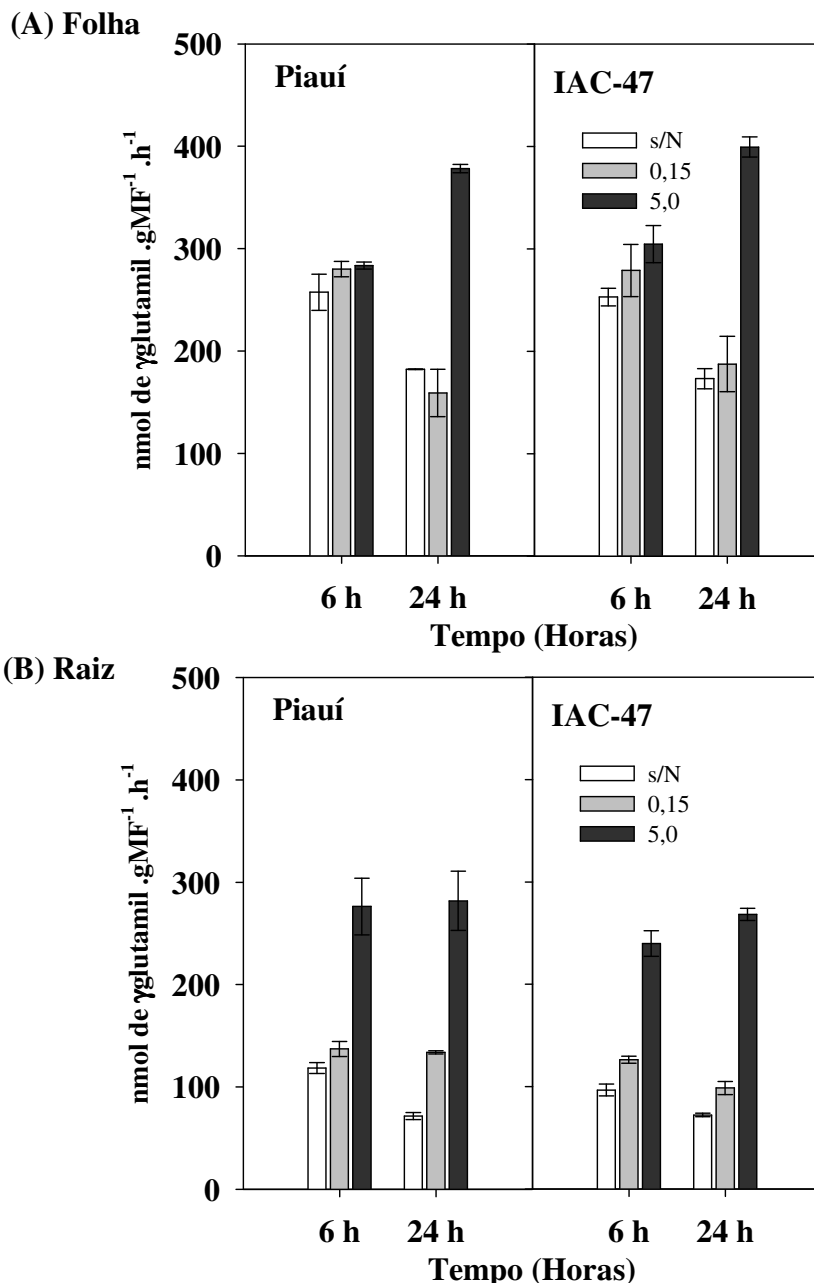


Figura 23. Atividade da Glutamina Sintetase em folhas e raízes de plantas de arroz, das variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio.

O aumento na atividade de GS nas raízes ocorre nas duas concentrações de NO_3^- sendo maior nas plantas que receberam 5mmol L^{-1} de NO_3^- assim com nas folhas. A atividade de GS nas folhas reflete o aumento significativo nos teores de N-amino. É provável que a síntese

de N-amino esteja ocorrendo nas raízes, que apresentou maior atividade de GS, e esteja sendo translocado para a parte aérea via floema.

A atividade de GS em folhas diminui após 24 horas, as plantas que permaneceram sem N e no ressuprimento com $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$ de NO_3^- . Essa queda na atividade pode ser resultado da queda nos teores de açúcares solúveis. A GS2 é a isoforma mais abundante em folhas fotossinteticamente ativas e sua atividade é controlada pelos teores de carboidratos (NUNES-NESI et al., 2010).

Nas folhas, a expressão de GS1.1 foi reduzida após a adição de NO_3^- (Figura 24 A), independente da concentração fornecida. Já nas raízes (Figura 24B) as respostas são muito pequenas nas primeiras 6 e 24 h após o fornecimento de NO_3^- . Há apenas uma pequena repressão no ressuprimento com 5 mM as 24h (Figura 24B). A outra isoforma citosólica GS1.2, ao contrário da GS1.1, não apresentou respostas às 6 horas nas folhas, contudo, às 24 horas o comportamento foi semelhante ao da *OsGS1.1*, com uma redução de expressão, exceto na variedade IAC-47 sob 5 mmol L^{-1} (Figura 24C). Já nas raízes há um aumento na expressão da *OsGS1.2* quando as plantas foram submetidas ao ressuprimento com NO_3^- em ambas as concentrações (Figura 24D). As 6h, só há aumento de expressão significativo para a variedade Piauí, ao passo que as 24h, o ressuprimento provoca aumento de expressão nas duas variedades independente da dose de ressuprimento (Figura 24D). Os genes que codificam para as enzimas de assimilação de NH_4^+ , GS e GOGAT, têm recebido uma grande atenção, pois são a principal rota da assimilação do N em plantas, através do ciclo GS/GOGAT. Em plantas superiores há duas principais isoformas de GS: a GS citosólica (GS1) e plástica (GS2). ZAO & SHI (2006) observaram uma redução na expressão de *OsGS1.1* e *GS1.2*, ambas citosólicas, em raízes de plantas de arroz ressupridas com $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ de NO_3^- , depois de 48 horas sem N. Essas mesmas plantas apresentaram um aumento da expressão de GS2. A GS1.1 é mais abundante em tecidos vasculares, tendo um importante papel na reciclagem e na remobilização de N para o grão (MASCLAUX-DRAUBRESSE et al., 2010, BERNARD & HABSH, 2009).

A expressão dos genes que codificam para GS pode ser alterada por diversos fatores como luz, estresse hídrico, temperatura e fornecimento de nutriente, principalmente nitrogênio. O nitrato controla a expressão de genes do metabolismo de C e N, e dentre esses, os genes que codificam para glutamina sintetase (SHEIBLE et al., 2004; WANG et al., 2001). Nas plantas que receberam nitrogênio após o período de deficiência o padrão de expressão dos genes de *OsGS1.1* e *OsGS1.2* são semelhantes (Figura 24), sendo um pouco maiores nas raízes. No entanto, em um trabalho realizado por ZHAO e SHI (2006) foi verificado o aumento na expressão gene *OsGS1.1* em folhas (2 vezes) e raízes (4 vezes) após o ressuprimento com baixo nível de N, para o gene *OsGS1.2* ocorre uma repressão da expressão nas folhas, enquanto nas raízes o aumento na expressão foi maior que o observado para o gene *OsGS1.1*.

Houve maior acúmulo de transcritos para GS2 nas raízes da variedade Piauí com alto e baixo ressuprimento de N- NO_3^- as 6 e 24h (Figura 25B). A variedade IAC-47 apresenta o mesmo padrão de expressão de GS2 que a Piauí, no entanto, com níveis inferiores (Figura 25B). ZHAO & SHI (2006) encontraram uma aumento na expressão do gene *OsGS2* nas raízes após o fornecimento de NO_3^- semelhante ao observado nesse trabalho para na variedade Piauí. Isso pode representar uma preferência de assimilação nas raízes por essa variedade em condições de "Flush" de N no solo, na a variedade IAC 47 parece ocorrer o mesmo porem em níveis mais baixos.

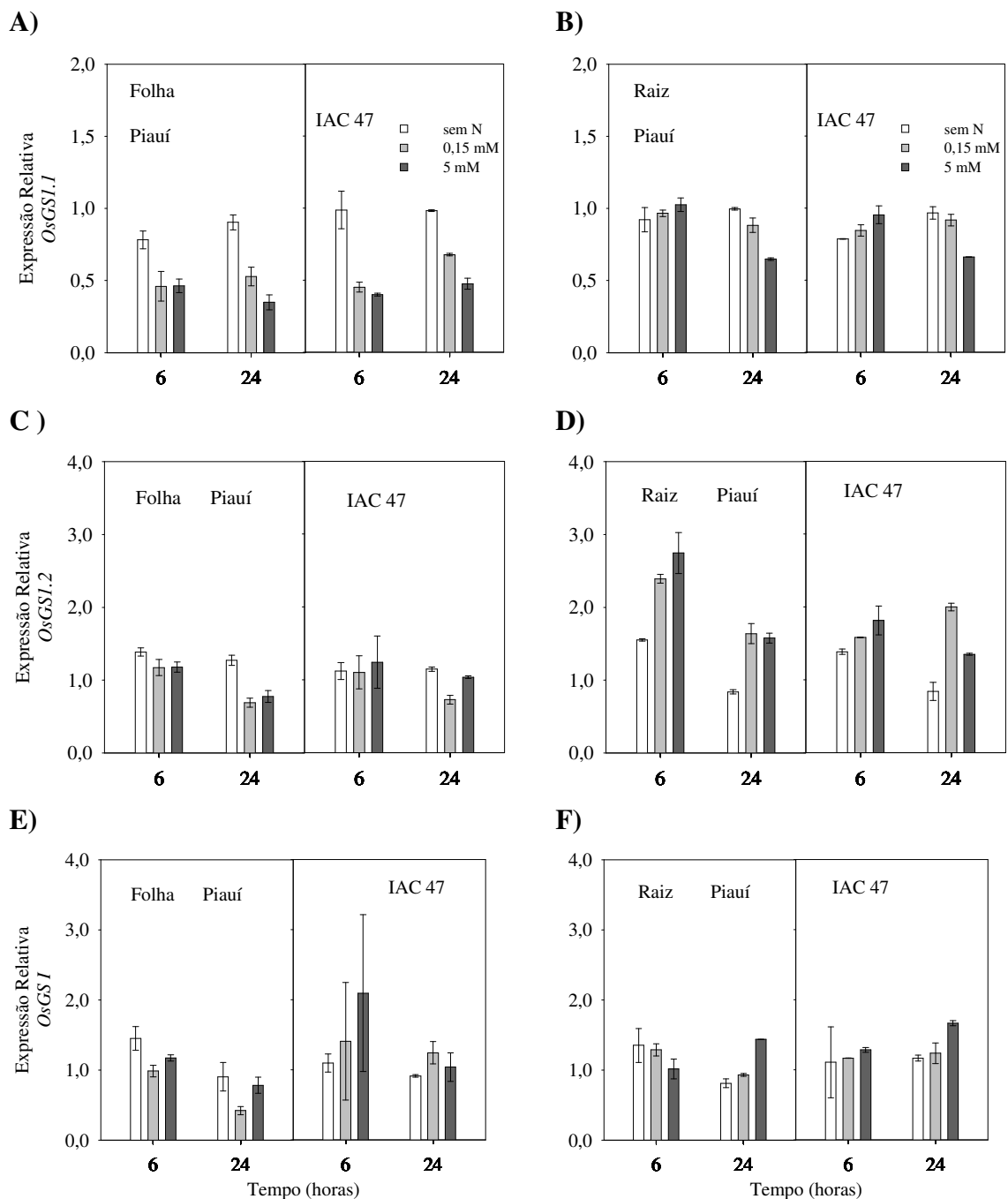


Figura 24. Expressão relativa dos genes que codificam para isoformas de Glutamina Sintetase citosólica de arroz, variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio.

A forma *OsGS2c* resultante do *splicing* alternativo do RNAm da GS2, apesar de sofrer grande indução por 0,15 mM de NO_3^- para a variedade Piauí (Figura 25), apresenta um acúmulo extremamente baixo de transcritos quando comparada com as outras isoformas, necessitando de em média de 5 a 8 ciclos a mais de PCR para atingir o limite de corte (*threshold*).

A expressão do gene GS2 mostrou um pequeno aumento nas folhas das duas variedades principalmente quando receberam ressurgimento com alta dose de N. Após seis

horas do fornecimento de NO_3^- as duas variedades apresentam a mesma resposta, enquanto que as 24 horas após o ressuprimento com NO_3^- apenas a variedade IAC-47 apresenta um aumento de expressão, sobretudo com $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$. Ao contrário do observado por (ZHAO & SHI, 2006) que mostram maior expressão do gene *OsGS2* nas folhas o ressuprimento com N-NO_3^- resultou em maior expressão nas raízes em ambas as variedades (Figura 25 A B).

As isoformas de GS citosólica (GS1) assimila o NH_4^+ derivado da absorção primária e de várias rotas internas de reciclagem de N (BERNARD & HABASH, 2009). Desta maneira a GS citosólica é essencial para a remobilização do N derivado da degradação de proteínas durante a senescência ou quando há escassez desse nutriente no solo. A GS citosólica é codificada por uma pequena família gênica em arroz (*GS1.1 - GS1.3*). A expressão gênica dos membros desta família são regulados pelo status de N da planta, assim como por condições ambientais. Estas respostas são observadas nas folhas das plantas de arroz (Figura 24 A), em que a expressão da *OsGS1.1* é reduzida pela metade após 6 e 24 horas do ressuprimento com NO_3^- , ou seja, após as plantas passarem de uma situação de deficiência de N por 72h e receberem novamente uma solução nutritiva contendo $0,15$ e 5 mmol L^{-1} de N-NO_3^- . Nas raízes, a redução na expressão de *OsGS1.1* ocorreu apenas 24 horas após o fornecimento do NO_3^- , com efeito mais pronunciado no ressuprimento com 5 mmol L^{-1} de NO_3^- .

A isoforma *OsGS1.2* apresenta um redução na expressão nas folhas 24 horas após o fornecimento de NO_3^- (Figura 24 C), no entanto, nas raízes há um aumento de até três vezes após 6 horas do fornecimento de NO_3^- e 1,7 vezes 24 horas após (Figura 24 D). Em *Arabidopsis* e arroz, a localização dessa enzima se correlaciona com o local de absorção de NH_4^+ , e é responsável pela assimilação do NH_4^+ absorvido (ISHIYAMA et al., 2004; SONODA et al. 2003), o que pode explicar a baixa resposta nas folhas após o ressuprimento com NO_3^- (Figura 24 C). No entanto, o aumento da expressão desse gene nas raízes sugere um aumento nos teores de NH_4^+ nesse tecido. Em raízes de aveia, em que a isoforma citosólica é predominante, a atividade de GS aumentou após o fornecimento de NO_3^- sem nenhuma alteração na quantidade de proteína (PEAT & TOBIN, 1996). Isso sugere que a GS citosólica esta envolvida na assimilação do NH_4^+ produzido na redução do NO_3^- nas raízes (TOBIN & YAMAYA, 2001) e que ocorre uma regulação pos-transcricional em resposta ao NO_3^- aumentando a atividade da enzima sem alterar sua quantidade.

Em folhas de gramíneas como trigo e arroz a GS citosólica é a menos abundante, mas considerada importante devido sua localização específica e funções fisiológicas (HABASH et al., 2001). Plantas de arroz mutantes, sem a isoforma GS1.1 quase não se desenvolvem (TABUCHI et al., 2005), e apresentam uma reduzida produção de grãos. No entanto, o papel da GS citosólica da raiz na assimilação primária de N não é bem compreendida (BERNARD & HABASH, 2009).

A isoforma plastídica (GS2) apresentou um grande aumento de expressão na raízes das plantas submetidas ao ressuprimento com NO_3^- (Figura 25). Este aumento foi mais pronunciado na variedade Piauí. A participação da GS plastidial na assimilação primária de N não tem sido muito estudada. Trabalhos com essa isoforma tem sido feito em estudos sobre fotorrespiração. Estudos com mutantes de aveia deficientes em GS2 não apresentou nenhum fenótipo anormal quando crescida sob condições de baixa fotorrespiração (LEEGOOD et al., 1995). Em alfafa, o fornecimento de NO_3^- aumentou a expressão de GS2 tanto em folhas como nas raízes, sendo a resposta mais rápida na raiz (ZOZAYA-HINCHLIFFE et al., 2005). A etapa final da redução do nitrato ocorre nos plastídios, tanto nas folhas como nas raízes, assim, o NH_4^+ produzido na redução do NO_3^- esta prontamente disponível para ser assimilado através da GS2, no entanto, pouca atenção tem sido dada a essa isoforma.

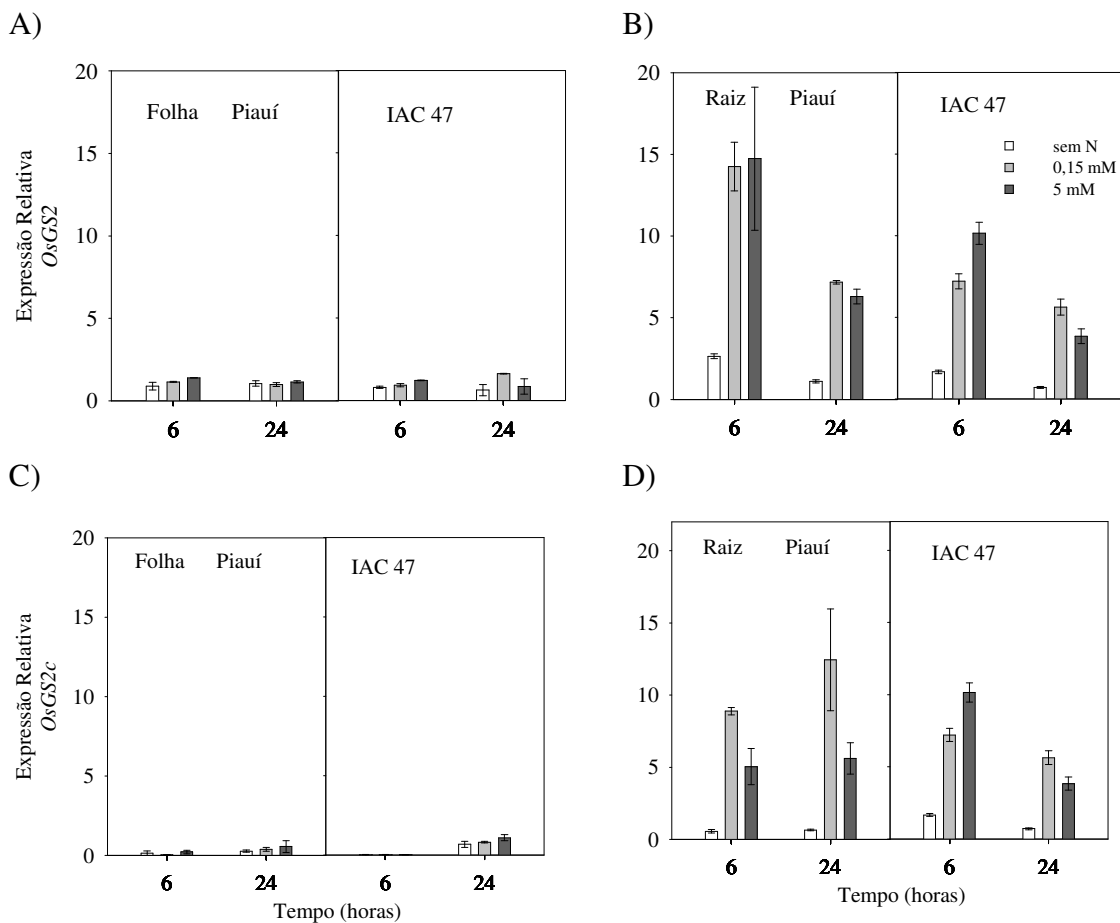


Figura 25. Expressão relativa dos genes que codificam para isoformas de Glutamina Sintetase plastídica de arroz, variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio.

Muitos estudos tem justificado a importância da GS no metabolismo do nitrogênio em plantas. Um grande atenção tem sido dedicada a estudos sobre a transformação de plantas para super-expressar genes de GS, visando elucidar o seu papel na eficiência de utilização de nitrogênio. Em plantas de arroz superexpressando os genes de *GSI.1*, *GSI.2* e uma GS de *Escherichia coli* (*glnA*) sob controle do promotor CaMV 35S, foi verificado um aumento da atividade total de GS na folha e concentrações de proteínas solúveis, elevação dos teores de aminoácidos ácidos totais e conteúdo de N (CAI et al. 2008). Isso demonstra que o metabolismo de N pode ser alterado pela atividade total da GS, ou ainda, de uma isoforma específica.

Os genes que apresentaram maiores respostas ao fornecimento de nitrato foram *OsNRT2.1* e *2.2* tanto sob baixa como alta concentração de nitrato (Figura 26). Esses resultados estão de acordo com os encontrados por ARAKI e HASEGAWA (2006). A indução da expressão do *OsNRT2.1* e *2.2* foi maior na variedade Piauí em todos os tratamentos (Figura 26). Após o ressuprimento nas duas doses com N-NO_3^- , houve repressão do *OsNRT2.3* as 6 e 24h, enquanto que para *OsNRT2.4* essa repressão só aparece as 24h (Figura 26). Resultados similares foram encontrados em *Arabidopsis*, em que os genes *AtNRT2* foram agrupados em três categorias: nitrato-induzíveis, nitrato-reprimidos e nitrato-constitutíveis (OKAMOTO et al., 2003).

Em *Arabidopsis*, foi verificada uma clara correlação positiva entre a absorção de nitrato e a quantidade de transcritos de *AtNRT2.1* (OKAMOTO et al., 2003). Em outro estudo, o bloqueio da expressão do *AtNRT2.1* foi suficiente para diminuir drasticamente a contribuição dos sistemas de alta afinidade (HATS), mostrando que o *AtNRT2.1* é o maior colaborador para esse sistema de absorção em *Arabidopsis* (LI et al., 2007). A maior expressão do *OsNRT2.1* e *2.2* na variedade Piauí, está de acordo com os resultados encontrados por (SANTOS et al., 2009b) que num estudo de cinética de absorção de NO_3^- , verifica que a variedade Piauí apresenta maior afinidade (menor K_M) e maior velocidade de absorção ($V_{\text{máx}}$) comparada à variedade IAC47. Em arroz, os transportadores *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* tem sido apontados como genes candidatos para o melhoramento de plantas visando maior eficiência no uso de N (ARAKI e HASEGAWA 2006).

O acúmulo de transcritos para o *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* (Figura 26A) atingem o valor máximo 6 horas após o ressuprimento com N-NO_3^- na variedade Piauí, enquanto, na variedade IAC-47 isso ocorre 24 horas após o ressuprimento com N-NO_3^- . As 24h de ressuprimento com 0.15mmol L^{-1} , o aumento de expressão do *OsNRT2.1* e *2.2* na variedade IAC-47 é um pouco maior comparado ao da variedade Piauí, no entanto, a resposta mais rápida da variedade Piauí (maior expressão as 6h) pode conferir uma vantagem adaptativa as condições de fluxo transitório de N. A variedade Piauí é originária do estado do Maranhão, uma região onde predomina duas estações climáticas bem definidas, representadas por um período de seca e outro de chuva. Com o início da estação chuvosa, após um longo período de seca, se inicia a mineralização da matéria orgânica e conseqüente aumento da disponibilidade de N, que em pouco tempo, torna-se escasso devido à lixiviação causada pelo excesso de chuva, ocorrendo assim um *flush* de N-NO_3^- . Nessas condições, devido às características químicas do ânion NO_3^- e das cargas do solo, a disponibilidade deste íon pode apresentar grande variação em um curto intervalo de tempo, sendo alvo de competição entre plantas e organismos no solo. É provável que as respostas da variedade Piauí estejam relacionadas a adaptação desta variedade à condições ambientais do seu local de origem.

Nos trabalhos de ARAKI e HASEGAWA (2006), a absorção aparente de NO_3^- aumentou constantemente após o fornecimento de NO_3^- por um período de 25 horas, onde o aumento na absorção foi acompanhado por um aumento na expressão do gene *OsNRT2.1*. Estes dados estão de acordo com os encontrados por SANTOS et al. (2009), que observa maiores valores de $V_{\text{máx}}$ para a variedade Piauí sob baixo suprimento de N. A $V_{\text{máx}}$ representa o influxo máximo do íon e está relacionada a uma maior quantidade de transportadores atuando na absorção. Os transportadores *OsNRT2.3* e *OsNRT2.4* se assemelham aos genes *AtNRT2.5* e *AtNRT2.7* (PLETT et al., 2010), que sofrem repressão por NO_3^- ou são expressos constitutivamente, e tem pouca participação no processo de absorção de NO_3^- (ARAKI e HASEGAWA, 2006).

A resposta mais rápida e em maior intensidade na variedade Piauí pode explicar o fato desta variedade apresentar maior eficiência de absorção de nitrato e atingir o $C_{\text{mín}}$ mais rápido do que a variedade IAC-47, como observado por SANTOS (2006). Essa resposta rápida provavelmente confere a variedade Piauí uma vantagem adaptativa durante o fluxo sazonal de N que ocorre na região tropical. Segundo GREENLAND (1958) e WETSELAAR (1961), o clima tropical, caracterizado por duas estações bem definidas (um período de chuvas e um período seco), ocasiona fluxos sazonais de nitrato no solo. O mesmo fenômeno parece ocorrer nas regiões do cerrado brasileiro, onde houve acúmulo de N-NO_3^- no solo em curto período de tempo na estação chuvosa (NARDOTO e BUSTAMANTE, 2003). Desta forma, o N está sujeito à lixiviação mais intensa durante a estação das chuvas, tornando-se disponível para as plantas apenas no início do período úmido, portanto, devendo ser absorvido rapidamente.

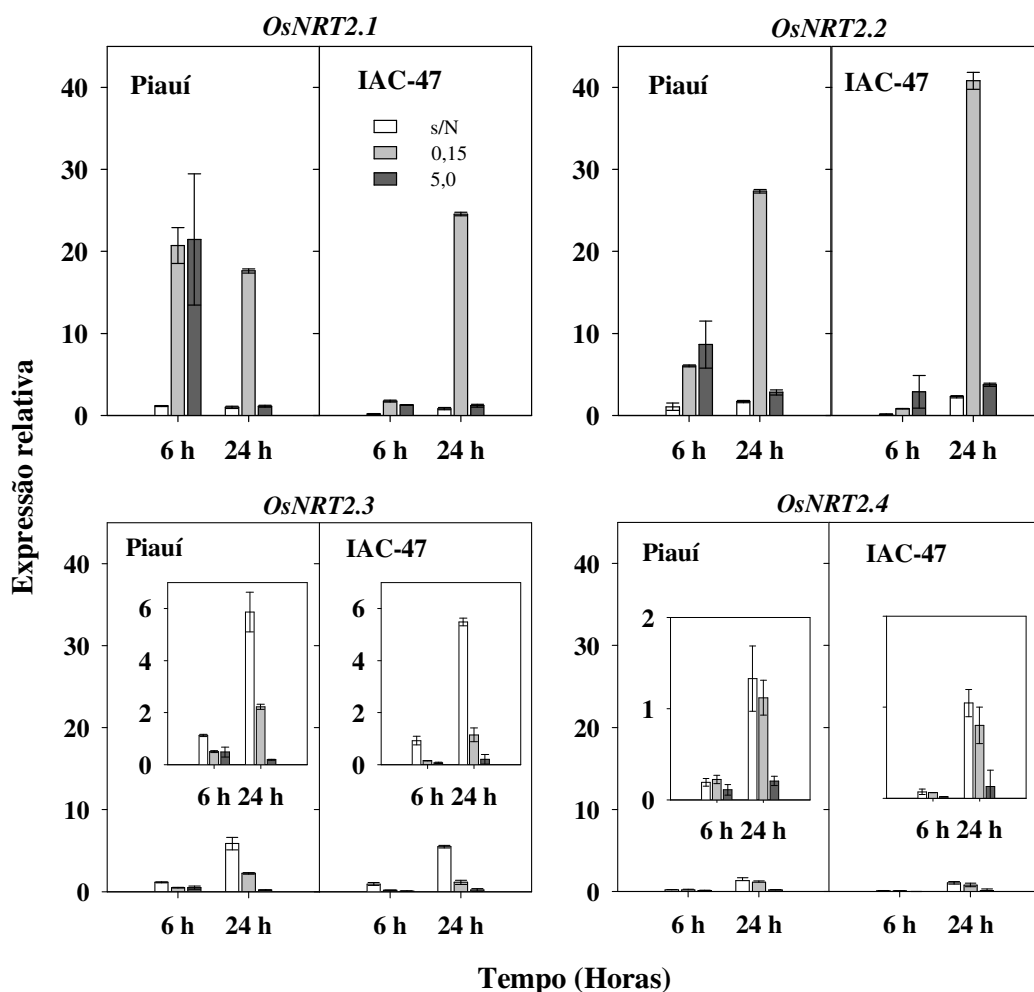


Figura 26. Expressão relativa dos genes que codificam para os transportadores de nitrato de alta afinidade, em raízes de plantas de arroz, variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO₃⁻, e plantas mantidas sem nitrogênio.

SANTOS (2006) verificou que mesmo apresentando um desenvolvimento do sistema radicular inferior ao da variedade IAC-47, a variedade Piauí quando submetida ao ressuprimento com 0,2 mmol L⁻¹ de N-NO₃⁻ consome o nitrato mais rapidamente. Além disso, as duas variedades atingem o C_{mín} (concentração do nutriente em solução nutritiva no qual o influxo líquido é zero) em concentrações diferentes de NO₃⁻ (SANTOS, 2006), o que também foi observado para NH₄⁺ por BAPTISTA et al. (2000). No trabalho de SANTOS (2006), o conteúdo de nitrato fornecido à variedade Piauí na dose de 0,2 mmol L⁻¹ chega a zero após 20 horas, enquanto a variedade IAC-47 parece não conseguir esgotar totalmente o conteúdo de NO₃⁻ da solução nutritiva. Esta observação sugere que a variedade Piauí possui um sistema de alta afinidade para absorção de nitrato mais eficiente que a variedade IAC-47 e corrobora com os maiores valores de expressão do *OsNRT2.1* e *2.2* encontrados nesse trabalho (Figura 26).

Os níveis de expressão dos *OsNRT2.1* e *2.2* foram elevados nas primeiras 6 horas nos dois níveis de NO₃⁻. As 24h após o ressuprimento de NO₃⁻ os níveis de expressão permanecem elevados nas plantas sob 0,15 mmol L⁻¹ de NO₃⁻, e retorna aos níveis basais nas plantas que receberam 5 mmol L⁻¹ de NO₃⁻. A expressão do NRT2 é regulada pela disponibilidade externa de N e pelo *status* de N da planta, que em *Arabidopsis* envolve um mecanismo com a participação do *AtNRT1.1* e proteínas cinase O que torna curioso o alto

nível de expressão as 6 horas sob alto e baixo nível de N. No entanto, a repressão mediada pelo *NRT1.1* depende do pré-tratamento em que as plantas foram submetidas. Quando as plantas são submetidas a um período de ausência de N, a participação do NRT1,1 é “anulada”. A queda na expressão do NTR2.1 e 2.2, reflete um maior status de N nessas plantas, envolvendo assim o NRT1.1 na repressão do NRT2.1.

A expressão das proteínas NAR2.1 apresentaram o mesmo padrão observado para os transportadores OsNRT2.1 e 2.2, sendo induzido após o fornecimento de NO_3^- . Esses resultados indicam a participação dessa proteína nos sistema de absorção de alta afinidade como verificado por FENG et al., (2011). Não foram observadas diferenças na expressão entre as variedade 6 após o ressuprimento de NO_3^- ao contrário do observado para os transportadores de alta afinidade (Figura 27). A proteína NAR2.2 diferente do observado para os transportadores OsNRT2.1 e .2.2 e à proteína NAR2.1, porem, parece ocorre um aumento na expressão desse gene após 24 horas e deficiência de N. A proteína NAR2.2 não interage com os transportadores NRT2 identificados em arroz (FENG et al., 2011) participando sistema de absorção, no entanto, a expressão dessa proteína responde ao nitrato.

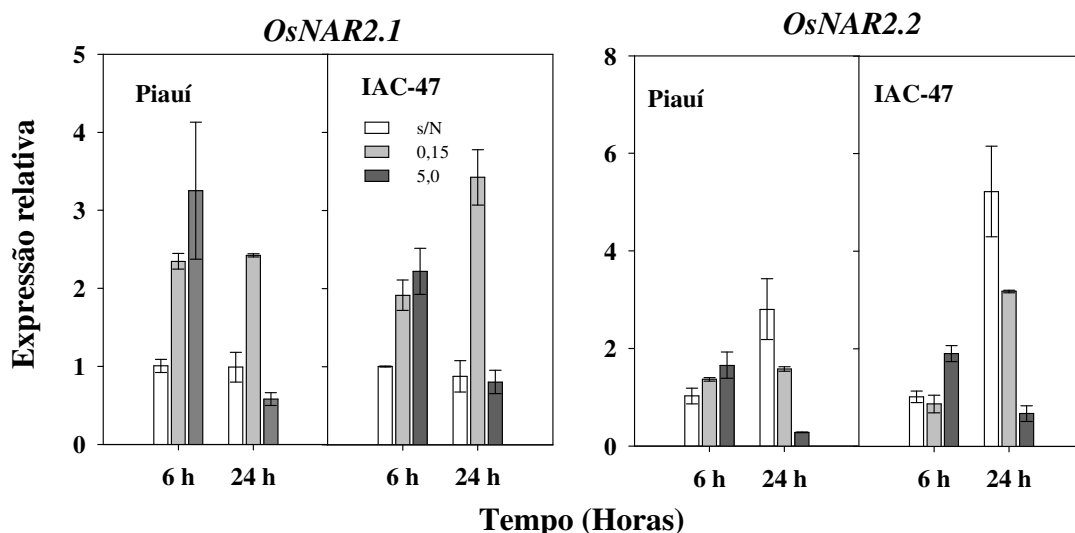


Figura 27 Expressão relativa dos genes que codificam para que codificam para proteínas NAR, em raízes de plantas de arroz variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio.

A expressão dos transportadores de baixa afinidade em resposta ao ressuprimento de NO_3^- foi diferente entre as variedades (Figura 28). Na variedade Piauí ocorre um aumento na expressão do gene *OsNRT1.1* e *1.2* as 6 horas após o suprimento de NO_3^- , enquanto na variedade IAC-47 parece ocorrer uma redução na expressão do *OsNRT1.1*. Assim como ocorre com os transportadores de alta afinidade, há uma resposta mais rápida da variedade Piauí. O transportador *OsNRT1.2* que apresentou elevada expressão nas raízes da plantas da variedade Piauí (Figura 28) apresentou um leve aumento nas plantas da variedade Piauí com ressuprimento de 5 mmol L^{-1} de NO_3^- . Ainda não foi esclarecido como esses genes atuam na absorção e translocação de NO_3^- . No entanto, verificamos mais uma vez uma resposta mais rápida na variedade Piauí indicando a melhor adaptação às flutuações na disponibilidade de N no solo.

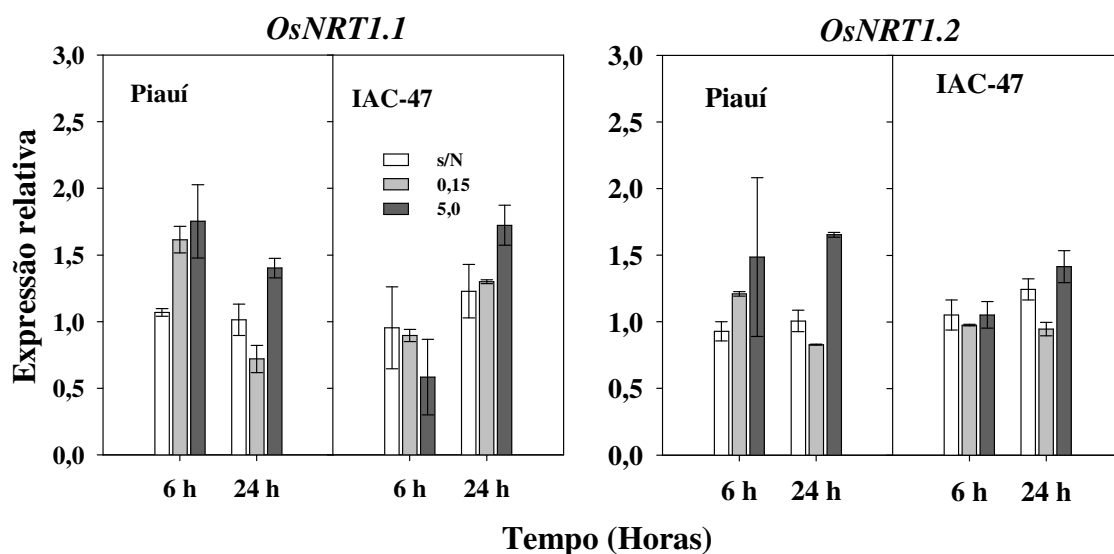


Figura 28. Expressão relativa dos genes que codificam para os transportadores de nitrato de baixa afinidade (NRT1), em raízes de plantas de arroz variedades Piauí e IAC-47, 6 e 24 horas após receberem 0,15 e 5 mM de NO_3^- , e plantas mantidas sem nitrogênio.

Dessa forma, é extremamente importante um sistema eficiente de absorção, para tornar possível, não somente a absorção de NO_3^- mas também os estoques internos de NO_3^- . Isto é possível por mecanismos que modulam a capacidade de absorção de acordo com a demanda da planta em resposta à variação espacial e temporal na disponibilidade de nutrientes no solo (SCHATCHMAN & SHIN, 2007).

No campo, quando não é realizado adubação, a maior parte do N é absorvida através do NRT2 (MALAGOLI et al., 2004). Isso mostra que a variedade Piauí pode apresentar uma maior vantagem sob baixo suprimento de NO_3^- , por apresentar níveis mais elevados de expressão de NRT2.

5 CONCLUSÕES

A variedade Piauí consegue manter a homeostase do seu metabolismo quando submetida a estresses ambientais como baixos níveis de N na solução do solo. Nossos resultados sugerem que esta característica está associada à manutenção de maior atividade de enzimas de assimilação como Nitrato Redutase e Glutamina Sintetase, e teores elevados de N-solúvel nos tecidos. Estas características resultam em maior resiliência em face às condições adversas da agricultura nas regiões tropicais. Variedades melhoradas como a IAC-47 aparentemente perderam essas características ao longo do processo de melhoramento.

A manutenção dos níveis elevados de metabólitos, e a maior atividade enzimática estão relacionados ao aumento na expressão dos genes que codificam para os transportadores de alta afinidade, OsNRT2.1, OsNRT2.2, OsNRT2.3 e OsNAR2.1 e o transportadores de baixa afinidade OsNRT1.2 e OsNRT1.3 e à maior estabilidade na expressão dos genes que codificam para as enzimas envolvidas no metabolismo de N (NR, GS, GOGAT) em condições de baixo suprimento de nitrato.

A maior expressão dos transportadores de NO_3^- resulta em resposta mais rápida à presença de NO_3^- no meio externo, apresentando maior expressão dos transportadores OsNRT2.1, OsNRT2.2 o que resulta em maior acúmulo de NO_3^- nos tecido. Esta característica permite a essa variedade se adequar à disponibilidade diferencial de N que ocorre nos sistemas naturais

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AN, D.; SU, J.; LIU, Q.; ZHU, Y.; TONG, Y.; LI, J.; JING, R.; LI, B.; LI, Z. Mapping QTLs for nitrogen uptake in relation to the early growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant and Soil**, v.284, p.73–84, 2006.
- ARAKI, R. & HASEGAWA H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. **Breeding Science**, v.56, p.295-302, 2006.
- ARAÚJO, E. S.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 38, n. 11, p. 1281-1288, 2003.
- ASANO, T.; WAKAYAMA, M.; AOKI, N.; KOMATSU, S.; ICHIKAWA, H.; HIROCHIKA, H.; OHSUGI, R. Overexpression of a calcium-dependent protein kinase gene enhances growth of rice under low-nitrogen conditions. **Plant Biotechnology**. v. 27, p. 369-373, 2010.
- ASHIKARI, M.; SAKAKIBARA, H.; LIN, S.; YAMAMOTO, T.; TAKASHI, T.; NISHIMURA, A.; ANGELES, E. R.; QIAN, Q.; KITANO, H.; MATSUOKA, M. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. **Science**. v. 309, p.741-745, 2005.
- BALAZADEH, S.; RIANO-PACHO, D. M.; MUELLER-ROEBER, B. Transcription factors regulating leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**. v. 10, p 63–75, 2008.
- 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**, 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.; MA, 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.
- BERNARD, S.M.; HABASH, D. Z. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist**. v.182, p. 608–620. 2009.
- BEUVE, N.; RISPAIL, N.; LAINE, P.; CLIQUET, J.B.; OURRY, A.; LE DEUNFF, E. Putative role of gamma-aminobutyric acid (GABA) as a long-distance signal in up-regulation of nitrate uptake in *Brassica napus* L. **Plant Cell and Environment**. v. 27, p. 1035-1046, 2004.
- BI, Y.-M.; KANT, S.; CLARK, J.; GIDDA, S.; MING, F.; XU, J.; ROCHON, A.; SHELPI, B.J.; HAO, L.; ZHAO, R.; MULLEN, R.T.; ZHU, T.; ROTHSTEIN, S.J. Increased nitrogen-use efficiency in transgenic rice plants over-expressing a nitrogen-responsive early nodulin gene identified from rice expression profiling. **Plant Cell Environ.**, v. 32, n.12, p. 1749-1760, 2009.
- BOBIK, K.; DUBY, G.; NIZET, Y.; VANDERMEEREN, C.; STIERNET, P.; KANCZEWSKA, J.; BOUTRY, M. Two widely expressed plasma membrane H⁺-ATPase

isoforms of *Nicotiana tabacum* are differentially regulated by phosphorylation of their penultimate threonine. **Plant Journal**, v. 62, n. 2, p.291-301, 2010.

BOUWMAN, A.F., BOUMANS, L.J.M., BATJES, N.H. Emissions of N₂O and NO from fertilized fields: summary of available measurement data. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 16, n. 4, p. 1058-1071, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAUER, E. K.; ROCHONA, R.; BI, Y. M.; BOZZOA, G. G.; ROTHSTEIN, S. J.; SHELPA, B. J. Reappraisal of nitrogen use efficiency in rice overexpressing glutamine synthetase. **Physiologia Plantarum**, v. 141, n. 4, p. 361-372, 2011.

BUCHANAN, R. B., GRUISSEM, W. & JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 4. ed. Rockville, Maryland. 2000. 1367p.

BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Effects of fusicoccin and vanadate on proton extrusion and potassium uptake by rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, p. 485-496, 2006.

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

BURNS, M. J.; NIXON, G. J.; FOY, C.A.; HARRIS, N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods –evaluation of outliers and comparison of calibration curves. **BMC Biotechnology**, v. 5, 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/5/31>> site on-line, n.p. Acesso em nov. 2008.

BUSTIN, SA, NOLAN, T. Pitfalls of Quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. **Journal of Biomolecular Techniques**, v15, p155-166. 2004.

CAI, C.; WANG, J-Y.; ZHU, Y.; SHEN, Q.; LI, B.; TONG, Y.; LI, Z. Gene structure and expression of the high affinity nitrate transport system in rice roots. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 4, p. 443-451, 2008.

CAKMAK, I.; HENGELER, C.; MARSCHNER, H. Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 45, p. 1251–1257, 1994.

CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E. & YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, v.6, p.853-855, 1975.

CAVICCHIOLI, R., CHIANG, R.C., KALMAN, L.V.; GUNSALUS, R.P. Role of the periplasmic domain of the Escherichia coli NarX sensor-transmitter protein in nitrate-dependent signal transduction and gene regulation. **Mol. Microbiol.** v.21, 901–911. 1996.

CEREZO, M.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUNOS, S.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.127, p.262-271, 2001.

CHO, Y.; JIANG, W.; CHIN, J. W.; PIAO, Z.; CHO, G.; MCCOUCH, S. R.; KOH, H. Z. Identification of QTLs associated with physiological nitrogen use efficiency in rice. **Mol. Cells**, v. 23, n. 1, p. 72-79, 2007.

- CHOU, C.C., CHEN C.H, LEE, T.T, PECK, K. Optimization of probe length and the number of probes per gene for optimal microarray analysis of gene expression. **Nucleic Acids Res**, v.32, n.12, e99. 2004. n.p. Disponível em <<http://nar.oxfordjournals.org/content/32/12/e99.full.pdf+html>>. Acesso em out. 2009.
- CLARKSON, D.T., HOPPER, M.J., JONES, L.H.P. The effect of root temperature on the uptake of nitrogen and the relative size of the root system in *Lolium perenne*: I. Solutions containing both ammonium ion and nitrate ion. **Plant Cell Environ**. v. 9, p. 535-546, 1986.
- COOKSON, S.J.; WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Light–dark changes in cytosolic nitrate pools depend on nitrate reductase activity in Arabidopsis leaf cells. **Plant Physiology**. v.138, p. 1097–1105, 2005.
- 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.
- CRAWFORD, N. M. Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell**, v. 7, p. 859-868, 1995.
- CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L. M. G. ; ROMANO, E.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; VASLIN, M.; ALVES-FERREIRA, M. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. **Molecular Breeding**, v. 23, p. 607-616, 2009.
- CZECHOWSKI, T., BARI, R.P., STITT, M., SCHEIBLE, W.R., AND UDVARDI, M.K. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. **Plant J**. v. 38, p. 366–379. 2004.
- CZECHOWSKI, T; STITT, M.; ALTMANN, T.; UDVARDI, M. K.; SCHEIBLE, W.R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 139, p. 5-17, 2005.
- DAVIES, D.B., SYLVESTER-BRADLEY, R., The contribution of fertiliser nitrogen to leachable nitrogen in the UK: a review. **J. Sci. Food Agric**. v. 68, p. 399–406, 1995.
- DE ANGELI, A.; MONACHELLO, D.; EPHRITIKHINE, G.; FRACHISSE, J.M.; THOMINE, S.; GAMBALE, F.; BARBIER-BRYGOO, H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. **Nature**, v. 442, n.24. p. 939-942. 2006.
- DE GROOT, C.C.; MARCELIS, L. F. M.; VAN DEN BOOGAARD, R.; KAISER, W. M.; LAMBERS, H. Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth. **Plant and Soil**. v. 248, n.1-2, p. 257-268. 2003.
- DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C-T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of Experimental Botany**. v. 62, p.1349–1359, 2011.
- DISTELFELD, A.; UAUY, C.; FAHIMA, T. Physical map of the wheat high-grain protein content gene Gpc-B1 and development of a high-throughput molecular marker. **New Phytologist**. v. 169, n.4, p. 753-763, 2006.
- DOWNS, C. G.; CHRISTEY, M. C.; DAVIES, K.M.; KING, G.A.; SEELYE, J.F.; SINCLAIR, B.K.; STEVENSON, D, G. Hairy roots of *Brassica napus*: II. Glutamine synthetase overexpression alters ammonia assimilation and the response to phosphinothricin. **Plant Cell Rep**, v. 14, p. 41–46, 1994.

- 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.
- DUBY, G.; POREBA, W.; PIOTROWIAK, D.; BOBIK, K.; DERUA, R., WAELEKENS, E.; BOUTRY, M. Activation of plant plasma membrane H⁺-ATPase by 14-3-3 proteins is negatively controlled by two phosphorylation sites within the H⁺-ATPase C-terminal region. **Journal Biological Chemistry**. v. 284, n. 7, p. 4213-4221, 2009.
- EULGEM, T. E SOMSSICH, I. E. Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 10, p. 366-371, 2007.
- FANG, Y.; YOU, J.; XIE, K.; XIE, W.; XIONG, L. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. **Molecular Genetics and Genomics**. v. 280, p.547-56, 2008.
- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, Chichester: John Wiley, 1980. p. 265-314.
- FEHLBAUM, P.; GUIHAL. C.; BRACCO, L.; COCHET, O. A microarray configuration to quantify expression levels and relative abundance of splice variants. **Nucleic Acids Res.** v. 33, n. 5, e47, 2005. Disponível em < <http://nar.oxfordjournals.org/content/33/5/e47.full.pdf>>, acesso em out. 2009.
- FEI, H.; CHAILLOU, S.; HIREL, B.; MAHON, J. D.; VESSEY, J. K. Overexpression of a soybean cytosolic glutamine synthetase gene linked to organ-specific promoters in pea plants grown in different concentrations of nitrate. **Planta**. v. 216, p. 467-474, 2003.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction. **Anal. Chem.**, v. 49, p. 1080-1080, 1977.
- FENG, H.; YAN, M.; FAN, X.; LI, B.; SHEN, B., MILLER, A. J.; XU, G. Spatial expression and regulation of rice high-affinity nitrate transporters by nitrogen and carbon status. **Journal of Experimental Botany**, v.67, n. 7, p. 2319-2332, 2011.
- FERNANDES, M. S. Effects of environmental stress on the relationship of free amino-n to fresh weight of rice plants. **Journal of Plant Nutrition**. v. 14, n. 11, p. 1151-1164, 1991.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, v.34, p.9-18, 1984.
- FERRAZ, A.S.D.; SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Nitrogen use efficiency for grain and protein production by rice genotypes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 435-442, 1997.
- FILLEUR, S.; DORBE, M.-F.; CERESO, M.; ORSEL, M.; GRANIER, F.; GOJON, A.; DANIEL-VEDELE, F. An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS Letter**, v.489, p.220-224, 2001.
- FORDE, B. G.; LEA, P. J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signaling. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, n. 9, p. 2339–2358, 2007.
- FRAISIER, V.; GOJON, A.; TILLARD, P.; DANIEL-VEDELE, F. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **Plant J.**, v. 23, p. 489-496, 2000.

- FU, J.; SAMPALO, R.; GALLARDO, F.; CÁNOVAS, F. M.; KIRBY, E. G. Assembly of a cytosolic pine glutamine synthetase holoenzyme in leaves of transgenic poplar leads to enhanced vegetative growth in young plants. **Plant Cell and Environment**, v.26, n.3, p.411–418, 2003.
- FUENTES, S.I.; ALLEN, D.J.; ORTIZ-LOPEZ, A.; HERNÁNDEZ, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 358, p. 1071-1081, 2001.
- GACHON, C. M. A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p. 1445-1454, 2004.
- GANSEL, X.; MUNOS, S.; TILLARD, P.; GOJON, A. Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in Arabidopsis: relation with long-distance and local controls by N status of the plant. **The Plant Journal**, v. 26, p. 143–155, 2001.
- GARRIDO, F. R. S.; GARRIDO, R. G.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R. ; FERNANDES, M. S. Rice varieties tonoplast and plasma membrane H⁺ATPases differential activities in response to nitrate pulses. **Journal of Biological Sciences**, v.8, n1, p. 107-112, 2008.
- GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIMAS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Res.**, v.6, p. 995-1001, 1996.
- GIRIN, T.; EL-KAFIFI, E. S.; WIDIEZ, T.; ERBAN, A.; HUBBERTEN, H.M.; KOPKA, J.; HOEFGEN, R.; GOJON, A.; LEPETIT, M. Identification of Arabidopsis mutants impaired in the systemic regulation of root nitrate uptake by the nitrogen status of the plant. **Plant Physiology**, v. 153, p. 1250–1260, 2010.
- GIRIN, T.; LEJAY, L.; WIRTH, J.; WIDIEZ, T.; PALENCHAR, P.M., NAZOA, P., TOURAINE, B, GOJON, A., LEPETIT, M. Identification of a 150 bp cis-acting element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status of the plant. **Plant, Cell and Environment**. v. 30, p. 1366–1380. 2007.
- GLASS, A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.453–470, 2003.
- GLASS, A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N.; KINGHORN, J. R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.; VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport system in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.855-864, 2002.
- GLASS, A. D.; SHAFF, J. E.; KOCHIAN, L. V. Studies of the uptake of nitrate in barley, IV. Electrophysiology. **Plant Physiology**. n. 99, p. 456–463, 1992.
- GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J. C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. **Current Opinion in Plant Biology**. 12, 328–338, 2009.
- GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D.G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, v. 9 n. 12, p.598-605, 2004.
- GREENLAND, D. J. Nitrate fluctuations in tropical soils. **Journal Agricultural Science**. v. 50, p. 82–91, 1958.
- GREGERSEN, P. L.; HOLM, P. B. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Biotechnology Journal**. v.5, n.1, p. 192-206, 2007.

- GUTIERREZ, L.; MAURIAT, M.; PELLOUX, J.; BELLINI, C.; WUYTSWINKEL, O. Towards a systematic validation of references in Real-Time RT-PCR. **The Plant Cell**, v. 20, p.1734–1735, 2008.
- HABASH, D. Z.; MASSIAH, A. J.; RONG, H. L.; WALLSGROVE, R. M.; LEIGH, R. A. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. **Annals of Applied Biology**, v.138, n.1, p.83–89, 2001.
- HARADA, H.; KUROMORI, T.; HIRAYAMA, T.; SHINOZAKI, K.; LEIGH, R. A. Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in Arabidopsis leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, AtCLC-c, to variation in nitrate levels. **Journal of Experimental Botany**. v.55, p. 2005-2014, 2004.
- HERMANS, C.; VERBRUGGEN, N. Physiological characterization of magnesium deficiency in Arabidopsis thaliana. **Journal of Experimental Botany**. v. 418, p. 2153-2161, 2005.
- HIRAI, M.Y.; YANO, M.; GOODENOWE, D.B.; KANAYA, S.; KIMURA, T. A.; WAZUHARA, M.; ARITA, M.; FUJIWARA, T., SAITO, K. Integration of transcriptomics and metabolomics for understanding of global responses to nutritional stresses in Arabidopsis thaliana. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 10205-10210, 2004.
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M. & GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1258-1270, 2001.
- HIREL, B.; GOUIS, J. L.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.2339-2358, 2007.
- HIREL, B.; LEA, P. J. Photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon and respiratory metabolism. In: FOYER, C. H.; NOCTOR, G. (Org.). **The biochemistry, molecular biology and genetic manipulation of primary ammonia assimilation**, Netherlands, Kluwer Academic, 2002. p.71-92,
- HO, C.H.; LIN, S.H.; HU, H.C.; TSAY, Y.F. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. **Cell** . v. 138, p. 1184–1194, 2009.
- HOAGLAND, D. R. & ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, Berkeley, California, 1950. 347p.
- HU, H.; DAI, M.; YAO, J. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 12987–12992, 2006.
- HU, H.; WANG, Y.; TSAY, Y. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. **The Plant Journal**. v. 57, p. 264–278, 2009.
- HU, Z. H.; LI, P.; ZHOU, M.Q.; ZHANG, Z.; WANG, L.; ZHU L.; ZHU, Y. Mapping of quantitative trait loci (QTLs) for rice protein and fat content using doubled haploid lines. **Euphytica**. v. 135, p. 47–54, 2004.

- ISHIMARU, K.; KASHIWAGI, T.; HIROTSU, N.; MADOKA, Y. Identification and physiological analyses of a locus for rice yield potential across the genetic background. **Journal of Experimental Botany**. v.56, n.420, p 2745-2753, 2005.
- ISHIYAMA, K., HAYAKAWA, T. AND YAMAYA, T. Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of nitrogen. **Planta**, v. 204, p. 288–294, 1998.
- ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; TABUCHI, M.; YAMAYA, T.; TAKOSASHI, H. Biochemical backgrounds of compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. **Plant Cell Physiol**. v. 45, p. 1640-1647, 2004a.
- ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; WATANABE-TAKOSASHI, A.; OBARA, M.; YAMAYA, T.; TAKOSASHI, H. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in Arabidopsis. **J. Biol. Chem**. v. 279, p. 16598-16605, 2004b.
- 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.
- JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; TYAGI, A. K; KHURANA, J. P. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. **Bioch. Bioph. Res. Comm**. v. 345, p 646–651, 2006.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate Reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- JIANG, L.; DAI, T.; JIANG, D.; CAO, W.; GAN, X.; WEI, S. Characterizing physiological N-use efficiency as influenced by nitrogen management in three rice cultivars. **Field Crops Research**. v. 88, p. 239-250, 2004.
- KANNAN, S.; NIELSEN, S. S.; MASON, A. C. Protein digestibility-corrected amino acid scores for bean and bean-rice infant weaning food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, n.10, p. 5070-5074, 2001.
- KANT, K.; BI, Y. M.; ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1499-1509, 2011.
- KIM, B. R.; NAM, H.Y.; KIM, S.U.; KIM, S.I.; CHANG, Y.J. Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1869-1872, 2003.
- KIRK, G. J. D.; KRONZUCKER, H. J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: Modeling study. **ANNALS OF BOTANY**, v.96, p.639-646, 2005.
- KLEIN, D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. **Trends in Molecular Medicine**. V.8 n.6, p.257-260, 2002.
- KOTHAPALLIT R, YODER SJ, MANE S, LOUGHRAN TPJ: Microarray results: how accurate are they? **BMC Bioinformatics**. v. 3, n. 1, p. 22-32. 2002.
- KRAPP, A.; SALIBA-COLOMBANI, V.; DANIEL-VEDELE, F. Analysis of C and N metabolisms and of C/N interactions using quantitative genetics. **Photosynthesis Research**. v.83, p. 251–263, 2005.

KREBS, M.; BEYHL, D.; GÖRLICHA, E.; AL-RASHEID, K. A. S.; MARTEN, I.; STIERHOFF, Y.-D.; HEDRICH, R.; SCHUMACHERA, K. Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. **PNAS**, v. 107, n. 7, p. 3251–3256, 2010.

KROUK, G. TRANCHINA, D.; LEJAY, L.; CRUIKSHANK, A.A.; SHASHA, D.; CORUZZI, G. M.; GUTIERREZ, R.A. A systems approach uncovers restrictions for signal interactions regulating genome-wide responses to nutritional cues in Arabidopsis. **PLoS Computational Biology**. 5, e1000326, 2009. *on line*, n.p.

Disponível em
<<http://www.ploscompbiol.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pcbi.1000326>>
acesso em: mai. 2009.

KROUK, G.; CRAWFORD, N.M.; CORUZZI, G.M.; TSAY, Y.F. Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. **Current Opinion in Plant Biology**. v.13, p. 1-8 2010.

KROUK, G.; TILLARD, P.; GOJON, A. Regulation of the high-affinity NO₃⁻ uptake system by NRT1.1-mediated NO₃⁻ demand signaling in Arabidopsis. **Plant Physiol.**, v. 142, p.1075-1086, 2006.

LANCIEN, M, MARTIN, M, HSIEH, M, H, LEUSTEK T, GOODMAN H, CORUZZI G M. *Arabidopsis* glt 1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilation pathway. **Plant Journal**. v. 29, p.347-358, 2002.

LEA, P.J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. 2. Amino acid metabolism. **Annals of Applied Biology**. v. 151, p. 269–275. 2007.

LEEGOOD, R.C.; LEA, P.J.; ADCOCK, M.D.; HAUSLER, R.E. The regulation and control of photorespiration. **Journal of Experimental Botany**. v.46, p. 1397–1414. 1995.

LI, C.; SANG, T. Rice domestication by reducing shattering. **Science**. v. 311, n. 5769, p. 1936 – 1939, 2006.

LI, W.; WANG, Y.; OKAMOTO, M.; CRAWFORD, N. M.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high affinity nitrate transporter gene cluster. **Plant Physiology**, v.143, p.425–433, 2007.

LIAN, X.; WANG, S.; ZHANG, J.; FENG, Q.; ZHANG, L.; FAN, D.; LI, X.; YUAN, D.; HAN, B.; ZHANG, Q. Expression profiles of 10,422 genes at early stage of low nitrogen stress in rice assayed using a cDNA microarray. **Plant Molecular Biology**, v. 60, p.617-631, 2006.

LIAN, X.; XING, Y.; XU, H.Y.C.; LI, X.; ZHANG, Q. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. **Theoretical and Applied Genetics**. v.112, p.85–96, 2005.

LIMAMI, A.; PHILLIPSON, B.; AMEZIANE, R.; PERNOLLET, N.; JIANG, Q.; ROY, R.; DELEENS, E.; CHAUMONT-BONNET, M.; GRESSHOFF, P. M.; HIREL, B. Does root glutamine synthetase control plant biomass production in *Lotus japonicus* L. **Planta**. v. 209, p. 495-502, 1999.

LIN, C.; KOH, S.; STACEY, G.; YU, S.; LIN, T. & TSAY, Y. Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. **Plant Physiology**, v.122, p.379-388, 2000.

- LIN, H.; SALUS, S. S.; SCHUMAKER, K. S. Salt sensitivity and the activities of the H⁺-ATPases in cotton seedlings. **Crop Science**, v. 7, n. 1, p. 190-197, 1997.
- LINKOHR, B.I.; WILLIAMSON, L.C.; FITTER, A.H.; LEYSER, H.M.O. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. **Plant Journal**. v. 29, p. 751–760. 2002.
- LITTLE, D.Y.; RAO, H.; OLIVA, S.; DANIEL-VEDELE, F.; KRAPP, A.; MALAMY, J.E. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 13693-13698, 2005.
- LIU, K.-H. & TSAY, Y.-F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. **The EMBO Journal**, v.22, p.1005–1013. 2003.
- LIU, K.-H.; HUANG, C.-Y.; TSAYA, Y.-F. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. **The Plant Cell**, v.11, p. 865-874, 1999.
- LIVAK, K.J.; CHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} method. **Methods**. v. 25, p. 402–408. 2001.
- LORKOWSKI, S.; CULLEN, P. High-throughput analysis of mRNA expression: microarrays are not the whole story. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. v. 14, n.3, p. 377-403, 2004.
- LOTHIER, J.; GAUFICHON, L.; SORMANI, R.; LEMAÎTRE, T.; AZZOPARDI, M.; MORIN, H.; CHARDON, F.; REISDORF-CREN, M.; AVICE, J. C.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. **Journal of Experimental Botany**, v.62, n. 4, p. 1375-1390. 2011.
- MACDUFF, J. H. & JACKSON, S. B. Growth and preferences for ammonium or nitrate uptake by barley in relation to root temperature. **Journal of Experimental Botany**, v.42, n.237, p.521-530, 1991.
- MAE, T.; KAI, N.; MAKINO, A.; OHIRA, K. Relation between ribulose biphosphate carboxylase content and chloroplast number in naturally senescing primary leaves of wheat. **Plant Cell Physiol.**, v.25, p.333-336. 1984.
- MAH, N.; THELIN, A.; LU, T.; NIKOLAUS, S.; KUHbacher, T.; GURBUZ, Y, EICKHOFF, H.; KLOPPEL, G.; LEHRACH, H.; MELLGARD, B.; COSTELLO, C.M.; SCHREIBER, S. A comparison of oligonucleotide and cDNA-based microarray systems. **Physiol Genomics**, v. 16, n. 3, p.361-370, 2004.
- MALAGOLI, P.; LAINE, P.; DEUNFF, E.; ROSSATO, L.; NEY, B.; OURRY, A. Modelling nitrogen uptake in oilseed rape cv. Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems. **Plant Physiology**. v. 134, p. 388–400. 2004.
- MANFIELD, I.W.; DEVLIN, P. F.; JEN, C.; WESTHEAD, D.R.; GILMARTIN, P M. Conservation, convergence, and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the *Arabidopsis* GATA gene family. **Plant Physiology**, v. 143, p. 941–958, 2007.
- MARSHALL, E. Getting the noise out of gene arrays. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 630-631, 2004.

MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALEZ-MORO, M.-B.; BETHENCOURT, L.; HABASH, D. Z.; LEA, P. J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K. J.; HIREL, B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. **The Plant Cell**, v.18, p.3252–3274, 2006.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; DANIEL-VEDELE, F.; DECHORGNAT, J.; CHARDON, F.; GAUFICHON, L.; SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants, challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1141–1157, 2010.

MENDONÇA, M. L. **Estudos dos mecanismos de tolerância ao alumínio e sua variabilidade genotípica em arroz (*Oryza Sativa*, L.)**. 1991. 176f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 1991.

MICHAEL, T.P., MOCKLER, T.C., BRETON, G., MCENTEE, C., BYER, A., TROUT, J.D., HAZEN, S.P., SHEN, R., PRIEST, H.D., SULLIVAN, C. M. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. **PLoS Genetics**, v. 4: e14, 2008. Disponível em <www.plosgenetics.org/article/info:doi/10.1371/journal.pgen.0040014> , acesso em jun. 2008.

MILLER, A. J. E SMITH, S. J. Nitrate transport and compartmentation in cereal root cells. **Journal of Experimental Botany**. v. 47, n. 300, p. 843-854. 1996.

MILLER, A.J., FAN, X., SHEN, Q., AND SMITH, S.J. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany** . v. 59, p.111–119, 2008.

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

MUÑOS, S.; CAZETTES, C.; FIZAMES, C, GAYMARD, F, TILLARD, P, LEPETIT, M, LEJAY, L, GOJON, A. Transcript profiling in the chl1-5 mutant of Arabidopsis reveals a role of the nitrate transporter NRT1.1 in the regulation of another nitrate transporter, NRT2.1. **Plant Cell**, v. 16, p. 2433-2447, 2004.

NARDOTO, G.B.; BUSTAMANTE, M.C. Effects of fire on soil nitrogen dynamics and microbial biomass in savannas of Central Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p.955-962, 2003.

NAVARRO, F.J, MARTIN, Y., SIVERIO, J.M. Phosphorylation of the yeast nitrate transporter Ynt1 is essential for delivery to the plasma membrane during nitrogen limitation. **J Biol Chem**. v.283, n.3, p.1208-31217, 2008.

NICOT, N.; HAUSMAN, J. H.; HOFFMANNL.; EVERS, D. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 421, p. 2907–2914, 2005.

NORTH, K.A.; EHLTING, B., KOPRIVOVA, A., RENNENBERG, H., KOPRIVA, S. Natural variation in Arabidopsis adaptation to growth at low nitrogen conditions. **Journal of Experimental Botany**. v. 47, p. 912–918, 2009.

- NUNES-NESE, A.; FERNIE, A. R.; STITT, M. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. **Molecular Plant**. v.3, n. 6, p. 973-996. 2010.
- OBARA, M.; KAJIURA, M.; FUKUTA, Y.; YANO, M.; HAYASHI, M., YAMAYA T, SATO, T. Mapping of QTLs associated with cytosolic glutamine synthetase and NADH-glutamate synthase in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 1209-1217, 2001.
- OKAMOTO, M.; KUMAR, A.; LI, W.; WANG, Y, SIDDIQI, M.Y, CRAWFORD, N.M, GLASS, A.D.M. High-affinity nitrate transport in roots of Arabidopsis depends on expression of the NAR2-like gene. AtNRT3.1. **Plant Physiology**. v. 140, p. 1036–1046, 2006.
- OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A. D. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.304–317, 2003.
- OLIVEIRA, I. C.; BREARS, T.; KNIGHT, T. J.; CLARK, A.; CORUZZI, G. M. Overexpression of cytosolic Glutamine Synthetase: relation to nitrogen, light, and photorespiration. **Plant Physiology**, v.129, p.1–11, 2002.
- ORSEL, M.; CHOPIN, F.; LELEU, O.; SMITH, S. J.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F.; MILLER, A. J. Characterization of a two component high affinity nitrate uptake system in Arabidopsis; physiology and protein–protein interaction. **Plant Physiology**, v.142, p.1304–1317, 2006.
- ORSEL, M.; KRAPP, A.; DANIEL-VEDELE, F. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis: structure and gene expression. **Plant Physiology**, v.129, p.886–896, 2002.
- ORTEGA, J.L, MOGUEL-ESPONDA, S., POTENZA, C, CONKLIN, C.F.; QUINTANA, A.; SENGUPTA-GOPALAN, C. The 3'-untranslated region of a soybean cytosolic glutamine synthetase (GS(1)) affects transcript stability and protein accumulation in transgenic alfalfa. **Plant J**. v. 45, p. 832–846, 2006.
- PALMGREN & M.G, CHRISTENSEN, G. Functional comparisons between plant plasma membrane H⁺-ATPase isoforms expressed in yeast. **J Biol Chem**. v 269, p. 3027–3033, 1994.
- 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.
- PEAT, L. J. & TOBIN, A. K. The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. **Plant Physiol**. v. 111, p. 1109–1117. 1996.
- PEIRSON, S.N; BUTLER, J.N.; FOSTER, R.G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. **Nucleic Acids Research**, v.31, -e73, 2003.
Disponível em <<http://nar.oxfordjournals.org/content/31/14/e73.full.pdf+html>> Acesso em nov. 2009.
- PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant Soil**, v.174, p.3–28, 1995.

- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, e45. 2001. Disponível em <<http://nar.oxfordjournals.org/content/29/9/e45.full>> , Acesso em: nov. 2009.
- PLETT, D.; TOUBIA, J.; GARNETT, T.; TESTER, M.; KAISER, B. N.; BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT Gene Families of Dicots and Grass Species. **PLoS One**. v. 5, n. 12, e15289, 2010.
- QIN, L.; PRINS, P.; JONES, J.T.; POPEIJUS, H.; SMANT, G.; BAKKER, J. & HELDER, J. GenEST, a powerful bidirectional link between cDNA sequence data and gene expression profiles generated by cDNA-AFLP. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.7, p.1616-1622, 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.
- QUESADA, A., KRAPP, A., TRUEMAN, L.J., DANIEL-VEDELE, F., FERNANDEZ, E., FORDE, B.G., CABOCHE, M. PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the *crnA* family. **Plant Mol. Biol.**, v.34, 265–274, 1997.
- RAMAMOORTHY, R.; JIANG, S.; KUMAR, N.; VENKATESH, P. N.; RAMACHANDRAN, S. A comprehensive transcriptional profiling of the *WRKY* gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. **Plant and Cell Physiology**, n. 49, v. 6, p. 865-879, 2008.
- REED, A. J.; BELOW, F. E.; HAGEMAN, R. H. Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and the protease activities during grain development in maize: variation between genotypes. **Plant Physiology**. v. 64, p. 164-170, 1980.
- REMANS, T., NACRY, P., PERVENT, M., GIRIN, T., TILLARD, P., LEPETIT, M., GOJON, A. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in Arabidopsis. **Plant Physiology**. v. 140, p.909–921. 2006.
- RICHARD-MOLARD, C.; KRAPP, A.; BRUN, F.; NEY, B.; DANIEL-VEDELE, F.; CHAILLOU, S. Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two arabidopsis genotypes, **Journal of Experimental Botany** . v.59, p. 779–791, 2008.
- RODRIGUES, F.S.; SOUZA, R.S.; RODRIGUES, F.S. & FERNANDES, M.S. Nitrogen metabolism in rice cultivated under seasonal flush of nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, p.395-409, 2004.
- RUBIN, G.; TOHGE, T.; MATSUDA, F.; SAITO, K.; SCHEIBLE, W.R. Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in Arabidopsis. **The Plant Cell**. v. 21, p. 3567–3584, 2009.
- RUFFEL, S.; FREIXES, S.; BALZERGUE, S.; TILLARD, P.; JEUDY, C.; MARTIN-MAGNIETTE, M.L.; VAN DER MERWE, M.J.; KAKAR, K.; GOUZY J.; FERNIE A.R.; UDVARDI, M.; SALON, C.; GOJON, A.; LEPETIT, M. Systemic signaling of the plant nitrogen status triggers specific transcriptome responses depending on the nitrogen source in *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**. v. 146, p. 2020-2035, 2008.

- SAKAKIBARA, H. Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. **Annual Review of Plant Biology**. 57, 431–449. 2006.
- SAKAMOTO, T.; MORINKA, Y.; OHNISHI, T.; SUNOHARA, H.; FUJIOKA, S.; UEGUGUCHI-TANAKA, M.; MIZUTANI, M.; SAKATA, K.; YOSHIDA, S. Erect leaves caused by brassinosteroid deficiency increase biomass production and grain yield in rice. **National Biotechnol.** v. 24, p. 105-109, 2006.
- SANDHU, D.; GILL, K. Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes **Plant Physiology**. n.128, p. 803-811, 2002.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; MONTE, R.; PINTON, R. & 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.
- 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.
- SANTOS, A.M. dos; BUCHER, C. A.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Efeito da disponibilidade de nitrato em solução nutritiva sobre a absorção de nitrogênio e atividade enzimática de duas cultivares de arroz. **Bragantia**. v. 68, p. 215-220, 2009a.
- SANTOS, A. M. s; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Effects of seasonal nitrate flush on nitrogen metabolism and soluble fractions accumulation in two rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, p. 1371-1384, 2007.
- SANTOS, L.A., SANTOS, W. A.; SPERANDIO, M. L.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S.R. FERNANDES, M. S. Nitrate uptake kinetics and metabolic parameters in two rice varieties grown in high and low nitrate. **Journal of Plant Nutrition**. v. 34, p.1–15, 2011.
- SANTOS, L.A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S.R. FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition**, v. 32, p. 549–564, 2009b.
- SANTOS, L. A. **Absorção e Remobilização de NO₃⁻ em arroz (*Oryza sativa* L.): atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo**. 2006. 88 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2006.
- SCHATCHTMAN, D. P.; SHIN, R. Nutrient sensing and signaling: NPKS. **Annu Rev Plant Biol.** v. 58, p.47-69, 2007.
- SCHEIBLE, W.R.; MORCUENDE, R.; CZECHOWSKI, T.; FRITZ, C.; OSUNA, D, PALACIOS-ROJAS, N.; SCHINDELASCH, D.; THIMM, O.; UDVARDI, M.K.; STITT M. Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of Arabidopsis in response to nitrogen. **Plant Physiology**, v. 136, p.2483–2499. 2004.
- SHEIBLE, W.; GONZÁLEZ-FONTES, A.; LAUERE, M.; MÜLLER-RÖBER, B.; CABOCHE, M.; STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. **The Plant Cell**, v. 9, p. 783-798, 1997.
- SHI, W. M.; XU W. F.; LI S. M.; ZHAO X. Q.; DONG G.Q. Responses of two rice cultivars differing in seedling-stage nitrogen use to growth under low-nitrogen conditions. **Plant and Soil**, v.326, p.291-302, 2010.

SHRAWAT, A. K. & GOOD, A. G. Genetic engineering approaches to improving nitrogen use efficiency. **ISB News Report**, p.1-5, 2008. Disponível em <<http://www.nbiap.vt.edu/news/2008/artspdf/may0801.pdf>>. Acesso em jul. 2008.

SILVA, D.; WITTEWER, C.T. Monitoring hybridization during polymerase chain reaction. **J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.** v.28, p. 3-13.2000.

SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S., OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate and carbon metabolites in *Zea mays* L. seedlings. **Plant Physiol.** v. 114, p. 583–589, 1997.

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.

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

SOUZA, S.R. & FERNANDES, M.S. Nitrogen-acquisition by plants in a sustainable environment. In: Singh, R.P. & Jaiwal, P.K. (eds.) **Biotechnological approaches to improve nitrogen use efficiency in plants**, Studium Press, LLC, Houston, Texas, USA, 2006, p.41-62.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, n. 21, p. 10, p. 2049-2063, 1998.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S.; MAGALHÃES, J.R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars, and crude protein of rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, n. 30, v. 5-6, p. 711-724, 1999.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; MAGALHÃES, J.R.; FERNANDES, M.S. Supplemental Nitrogen Applied during the Senescence on Two Rice Varieties: Evaluation of Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase Activities and Crude Protein. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, v.8, n.1, p.87-95, 2002.

SPERANDIO, M. V.S.; SANTOS, L.A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, .M.S.; SOUZA, S. R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**. v. 180, n. 2, p. 251-258, 2011.

STITT, M.; MULLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A.. Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 959–970, 2002.

SUN, H.; HUANG Q-M.; SU, J. Highly effective expression of glutamine synthetase genes *gs1* and *gs2* in transgenic rice plants increases nitrogen-deficiency tolerance. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**. v. 31, n. 5, p. 492-498, 2005.

SWARBRECK, S.M.; DEFOIN-PLATEL, M.; HINDLE; M.; SAQ, M.; HABASH, D. Z. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1511–1522, 2011.

SZE, H., & M.G. PALMGREN. Energization of plant cell membranes by H⁺-pumping ATPases: regulation and biosynthesis. **The Plant Cell**. v. 11,; n. 67, p. 677- 689, 1999.

- TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2319–2327, 2007.
- TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKOSASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **The Plant Journal**, v.42, p.641–651, 2005.
- TAKAYANAGI, S.; TAKAGI, Y.; ARAKI R.; HASEGAWA, H. High-affinity nitrate uptake by rice (*Oryza sativa*) coleoptiles. **Journal of Plant Research**, v. 124, n.2, p. 305-309.2010.
- TAMURA, W.; HIDAKA, Y.; TABUCHI, M.; KOJIMA, S.; HAYAKAWA, T.; SATO, T.; OBARA, M.; KOJIMA, M.; SAKAKIBARA, H.; YAMAYA, T. Reverse genetics approach to characterize a function of NADH-glutamate synthase1 in rice plants. **Amino Acids**, v. 39, p.1003–1012. 2010.
- TAN, P.K.; DOWNEY, T.J.; SPITZNAGEL, E.L.J.; XU, P.; FU, D.; DIMITROV, D.S.; LEMPICKI, R.A., RAAKA, B.M., CAM, M.C. Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 19, p.5676-5684. 2003.
- TARIS, N.; LANG, R. P.; CAMARA, M. D. Sequence polymorphism can produce serious artefacts in real-time PCR assays: hard lessons from Pacific oysters. **BMC Genomics**, v. 9, 2008. Disponível em <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/234>> Acesso em: dez. 2009
- TENG, Y-B.; LI, Y-J.; FANG, P.; LA G-X. Characterization of nitrogen metabolism in the low-nitrogen tolerant *lnt1* mutant of *Arabidopsis thaliana* under nitrogen stress. **Pedosphere**, v. 20, n. 5, p. 623–632, 2010.
- TESTER, M.; DAVENPORT, R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. **Annal of Botany**, v. 91, p. 503–527, 2003.
- TICHOPAD, A., DILGER, M., SCHWARZ, G., PFAFFL, M.W. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. **Nucleic Acids Res.** 31, E122. 2003. Disponível em <<http://nar.oxfordjournals.org/content/31/20/e122.abstract>> , Acesso em nov. 2009.
- TOBIN, A.K. & YAMAYA, T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. **Journal Experimental Botany**. v. 52, p.591-604, 2001.
- TONG, Y.; ZHOU, J.-J.; MILLER, A. J. A two-component high-affinity nitrate uptake system in barley. **Plant Journal**, v.41, p.442-450, 2005.
- TSAY Y.-F., CHIU C.-C., TSAI C.-B., HO C.-H. & HSU P.-K. Nitrate transporters and peptide transporters. **FEBS Letters**. v. 581, p. 2290–2300. 2007.
- UAUY, C.; BREVIS, J.C.; DUBCOVSKY, J. The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, n. 11, p. 2785-2794, 2006.
- UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W.R. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. **The Plant Cell**, v. 20, p.1736–1737, 2008.
- UNNO H, UCHIDA T, SUGAWARA H, KURISU, G.;SUGIYAMA, T.;YAMAYA, T.;SAKAKIBAR, H.;HASE, T.;KUSUNOKI, M. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. **Journal of Biol Chem**. v. 29, n. 281, p.29287-29296, 2006.

- VERT, G.; CHORY, J. Toggle switch in plant nitrate uptake. **Cell**. v. 138, n. 6, p. 1064-1066, 2009.
- VIDMAR, J. J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M. Y.; SCHJOERRING, J. K.; TOURAINÉ, 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, H.; GARVIN, D. F.; KOCHIAN, L. V. Nitrate-induced genes in tomato roots. array analysis reveals novel genes that may play a role in nitrogen nutrition. **Plant Physiology**, v.127, p.345-359, 2001.
- WANG, R.; GUEGLER, K.; LABRIE, S. T. & CRAWFORD, N. M. Genomic analysis of a nutrient response in arabidopsis reveals diverse expression patterns and novel metabolic and potential regulatory genes induced by nitrate. **The Plant Cell**, v.12, p.1491-1509, 2000.
- WANG, R.; OKAMOTO, M.; XING, X. & CRAWFORD, N.M. microarray analysis of the nitrate response in arabidopsis roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. **Plant Physiology**, v.132, p.556-567, 2003.
- WANG, R.C., XING, X., WANG, Y., TRAN, A., CRAWFORD, N.M. A genetic screen for nitrate regulatory mutants captures the nitrate transporter gene NRT1.1. **Plant Physiology**, v. 151, p. 472–478, 2009.
- WETSELAAR, R. Nitrate distribution in tropical soils. II. Extent of capillary accumulation of nitrate during a long dry period. **Plant and Soil**, v. 15, p.121-133. 1961.
- WIRTH J., CHOPIN F., SANTONI V., VIENNOIS G., TILLARD P., KRAPP A., LEJAY L., DANIEL-VEDELE F.&GOJON A. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 282, p. 23541-23552, 2007.
- XU, W.F.; SHI, W.M. expression profiling of the 14-3-3 gene family in response to salt stress and potassium and iron deficiencies in young tomato (*Solanum lycopersicum*) roots: analysis by real-time RT-PCR. **Annals of Botany**. v. 98, n. 5, p. 965–974. 2006.
- YAN, F.; ZHU, Y.; MÜLLER, C.; ZÖRB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H⁺-Pumping and plasma membrane H⁺-ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiol**. v.129, p. 50-63, 2002.
- YANAGISAWA, S.; AKIYAMA, A.; KISAKA, H.; UCHIMIYA, H.; MIWA, T. Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: improved nitrogen assimilation and growth under low nitrogen conditions. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v.101, p. 7833–7838. 2004.
- YANG, SCHEFFLER, B. E., WESTON L. A. Recent developments in primer design for DNA polymorphism and mRNA profiling in higher plants. **Plant Methods**, n 2, p. 1746-4811-2, 2006.
- YAUK, CL.; BERNDT, ML.; WILLIAMS, A.; DOUGLAS, G.R. Comprehensive comparison of six microarray technologies. **Nucleic Acids Res**. n 32, v15, e124. 2004. Disponível em <<http://nar.oxfordjournals.org/content/32/15/e124.abstract>> Acesso em nov. 2009.
- YEMM, E.W. & COCKING, E.C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Anal. Biochem.**, v.80, p.209-213, 1955.

- YEMM, E.W. & WILLIS, A.I. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J.**, v.57, p.508-514, 1957.
- YONG, Z.; KOTUR, Z.; GLASS, A.D. Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal**, v. 63, p. 739–748, 2010.
- ZHANG, N.; GIBON, Y.; GUR, A.; CHEN, C.; LEPAK, N.; HOHNE, M.; ZHANG, Z.; KROON, D.; TSCHOEP, H.; STITT, M.; BUCKLER, E. Fine quantitative trait loci mapping of carbon and nitrogen metabolism enzyme activities and seedling biomass in the maize ibm mapping population. **Plant Physiology**. v. 154, p. 1753-1765, 2010.
- ZHAO, D.; OOSTERHUIS, D.M.; BEDNARZ, C.W. Influence of potassium deficiency on photosynthesis, chlorophyll content, and chloroplast ultrastructure of cotton plants. **Photosynthetica**, v .39, p.103–109, 2001.
- ZHAO, X-Q., SHI, W.M. Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Plant Science**. v. 170, n. 4, p. 748-754, 2006.
- ZHOU, J. L.; WANG, X. F.; JIAO, Y. L.; QIN, Y. H.; LIU, X. G.; HE, K.; CHEN, C.; MA, L. G.; WANG, J.; XIONG, L. Z.; ZHANG, Q. F.; FAN, L. M.; DENG, X. W. Global genome expression analysis of rice in response to drought and high-salinity stresses in shoot, flag leaf, and panicle. **Plant Molecular Biology**. v. 63, n. 5, p. 591-608, 2007.
- ZHOU, J.J.; FERNANDEZ, E.; GALVAN, A.; MILLER, A. J. A high affinity nitrate transport system from *Chlamydomonas* requires two gene products. **FEBS Letts**.v.466, p.225–227, 2000.
- ZHOU, Y.; CAI, H.; XIAO, J.; LI, X.; ZHANG, Q.; LIAN, X. Over-expression of aspartate aminotransferase genes in rice resulted in altered nitrogen metabolism and increased amino acid content in seeds. **Theor Appl Genet**, v. 118, p. 1381–1390, 2009.
- ZHU, Y.; DI, T.; XU, G.; CHEN, X.; ZENG, H.; YAN, F.; SHEN, Q. Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. **Plant, Cell and Environmen**. v. 32, p. 1428-1440, 2009.
- 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.
- ZOZAYA-HINCHLIFFE, M.; POTENZA, C.; ORTEGA, J. L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Nitrogen and metabolic regulation of the expression of plastidic glutamine synthetase in alfalfa (*Medicago sativa*). **Plant Science**. v. 168, p. 1041-1052, 2005.