

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

DISSERTAÇÃO

Similaridade Genética entre Variedades de Arroz
Utilizando RAPD e Avaliação da Cinética de
Absorção e de Expressão de Transportadores de
Nitrato

Osmário José Lima de Araújo

2010



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

**SIMILARIDADE GENÉTICA ENTRE VARIEDADES DE ARROZ
UTILIZANDO RAPD E AVALIAÇÃO DA CINÉTICA DE ABSORÇÃO E
DE EXPRESSÃO DE TRANSPORTADORES DE NITRATO**

OSMÁRIO JOSÉ LIMA DE ARAÚJO

Sob a Orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

e Co-orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2010

631.4

A663s

T

Araújo, Osmário José Lima de, 1981-
Similaridade genética entre
variedades de arroz utilizando RAPD
e avaliação da cinética de absorção
e de expressão de transportadores de
nitrato / Osmário José Lima de
Araújo - 2010.
44 f. : il.

Orientador: Sonia Regina de
Souza.

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

Bibliografia: f. 39-44.

1. Solos - Absorção - Teses. 2.
Nitratos - Absorção - Teses. 3.
Arroz - Teses. I. Souza, Sonia
Regina de, 1962-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em
Agronomia. III. Título.

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

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

OSMÁRIO JOSÉ LIMA DE ARAÚJO

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 24/02/2010

Profa. Sonia Regina de Souza. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Prof. Luiz Mors Cabral. Dr. UFF

Prof. Munir Mauad. Dr. UFGD

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Osmar Alves de Araújo e Maria Macedo Lima por todo amor que me deram e por todos os sacrifícios que fizeram em função do meu bem estar e realização dos meus sonhos.

À minha orientadora Profa. Sonia Regina de Souza por ter me acolhido por vários anos sob sua orientação e pelos constantes apoio e incentivo que foram indispensáveis à minha permanência na pesquisa durante e após a conclusão da graduação.

Ao meu co-orientador Prof. Manlio Silvestre Fernandes pela oportunidade junto ao seu grupo de pesquisa e pela orientação sempre paciente atenciosa.

À minha amiga Marian Lis Martinez Stark por todo incentivo e apoio nos trabalhos e nas horas difíceis.

Ao meu amigo Marco Andre Alves de Souza que me acompanha e apóia desde meus primeiros passos na iniciação científica.

Aos amigos dos laboratórios de bioquímica de plantas e cultura de tecidos, Diego de Mello, Milena Silva Pinto, Marcela Jacques, Alana Gabriela e Rafael Gonçalves Ramos que sempre me ajudaram no que foi necessário e sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao professor Dr. Leandro Azevedo Santos e ao doutorando Carlos Alberto Bucher por terem compartilhado comigo inúmeras de suas experiências referentes às atividades necessárias à realização deste trabalho.

Aos amigos Wardsson Borges Lustrino e Samuel Ribeiro Passos por terem compartilhado experiências e pelo auxílio na utilização do Software GelCompar II.

Aos amigos colegas do laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, Vinícius Miranda, Marcos Vinicius Loss Sperandio, Rafael Passos Rangel, Leandro Martins Ferreira, Carlos Eduardo e Cássia Pereira, que no dia a dia do laboratório sempre compartilharam experiências e se dispuseram a ajudar sempre que solicitados.

A CAPES pelo fomento e apoio através da bolsa de estudo

À coordenação do CPGA-CS pelos esforços em busca da melhoria e manutenção da qualidade do curso bem como aquisição de recursos.

RESUMO

ARAÚJO, Osmário José Lima de. **Similaridade genética entre variedades de arroz utilizando RAPD e avaliação da cinética de absorção e de expressão de transportadores de nitrato**. 2010. 44f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

A maior eficiência de absorção de N a partir de baixas concentrações na solução externa, e a capacidade de acúmulo desse nutriente poderia propiciar um maior estoque de N no período vegetativo, que durante o enchimento dos grãos seria o responsável pelo maior teor de proteína nos grãos das variedades locais de arroz (*Oryza sativa*). Desta forma, neste projeto para se identificar os mecanismos metabólicos responsáveis por esta eficiência inicialmente foram comparadas 56 variedades locais de arroz e 10 variedades melhoradas quanto a suas similaridades genéticas utilizando-se a técnica de RAPD. Entre os dois principais agrupamentos obtidos foram selecionadas as variedades contrastantes IAC-47, Bico Ganga e Revenda do Grupo I e Manteiga do Grupo II, levando-se em consideração também os teores de proteína bruta dos grãos. As variedades foram avaliadas quanto aos parâmetros cinéticos de absorção de nitrato e quanto à cinética de expressão dos genes que codificam os transportadores nitrato de alta afinidade. O dendrograma de similaridade genética apresentou dois grandes grupos: Grupo I e Grupo II. O grupo I se mostrou bastante heterogêneo quanto à origem das variedades analisadas. Todas as variedades melhoradas agruparam no Grupo I. A maior parte das variedades de nome Lajeado provenientes de banco germoplasma esta no grupo I. O grupo II agrupou exclusivamente variedades provenientes das lavouras do estado do Maranhão, o que sugere uma estreita base genética das variedades lá cultivadas. Os grãos mais finos e longos (com maior relação comprimento largura – C/L) estavam nas variedades de arroz no Grupo I, enquanto no Grupo II os grãos de arroz foram mais redondos, ou seja, com as menores relações C/L. As variedades Revenda e Manteiga apresentaram maior expressão dos transportadores de alta afinidade OsNRT2.1 e 2.2, em todos os tempos. Ao se comparar a cinética de absorção de nitrato com a expressão dos transportadores foi observado que a variedade IAC-47 apresenta a menor $V_{máx}$, e que não houve grande aumento da expressão do NRT2.1. A variedade IAC-47, apesar de pertencer ao mesmo agrupamento de similaridade genética da variedade Revenda e terem ambas, tamanhos de grãos e relações comprimento largura semelhantes, apresentaram apenas 65% de similaridade genética. Portanto os resultados obtidos mostram que a variedade de arroz Revenda possui mecanismos que propiciam maior capacidade de absorção de nitrato, quando ele está disponível para a planta.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. Expressão gênica. Absorção de nitrato.

ABSTRACT

ARAÚJO, Osmário José Lima de. **Genetic similarity in rice varieties using RAPD and evaluation of the absorption and expression kinetics of nitrate transporters.** 2010. 44p. Dissertation (Master Science in Agronomy – Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

The largest efficiency of N uptake from low concentrations in the solution, and the capacity of accumulation of this nutrient could propitiate a larger stock of N in the vegetative period, which during the grains development would be the responsible for the largest protein in the grains of the traditional rice (*Oryza sativa*) varieties. Thus, in this study, to identify the metabolic mechanisms responsible for this efficiency 56 traditional rice varieties and 10 improved varieties were compared for their genetic similarities, using the RADP technique. Among the two main groups obtained, the contrasting varieties IAC-47, Bico Ganga and Revenda were selected to represent the Group I, and Manteiga for Group II. It was also considered the crude proteins content of the grains. The varieties were evaluated for the kinetic parameters of absorption of nitrate and kinetics of expression of the genes that codify high affinity nitrate transporters. The genetic similarity resulted in two great groups: Group I and Group II. The group I was shown to be quite heterogeneous as for the origin of the analyzed varieties. All of the improved varieties were contained in the Group I. Most of the varieties named Lageado, originated from the germoplasm bank were in the Group I. The group II contained exclusively varieties form farms in the State of Maranhão, what suggests a narrow genetic base of the varieties. The rice varieties with thinnest and longest grains (with larger relationship length width – L/W) were in the Group I, while in the Group II they were more rounded, in other words, with the smallest relationships L/W. The varieties Revenda and Manteiga presented larger expression of high affinity transporters OsNRT2.1 and 2.2, in all times. When compared the kinetics of absorption of nitrate with the expression of the transporters it was observed that the variety IAC-47 presented the smallest $V_{m\acute{a}x}$, and that there was not great increase of the expression of NRT2.1. the variety IAC-47, despite of belonging to the same grouping of genetic similarity of the variety Revenda and both with similar size of grain and length/width ratios, presented only 65% of genetic similarity. Therefore the results showed that the rice variety Revenda has mechanisms that propitiate larger capacity of nitrate absorption when it is available to the plant.

Key words: *Oryza sativa*. Gene expression. Nitrate uptake.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de amplificação de DNA utilizando-se um primer para RAPD de seqüência 5-ACGTAATCCG-3'. A – DNA genômico dupla fita; B – Anelamento do primer após desnaturação do DNA; C e D – Fragmentos de DNA formados ao final do 1º ciclo a partir de uma única dupla fita de DNA genômico.....	3
Figura 2. Bandas geradas pela amplificação de DNA de variedades de arroz (1 a 10) com o primer OPA-07. As colunas representam: M – Marcador 100 bp DNA Ladder, 1- Lageado (Arari-MA); 2 – Braquiária (Vitória do Mearim-MA); 3 – Lageado liso (Vitória do Mearim-MA); 4 – Vermelho 1; 5 – Lageado sem pêlo 220018; 6 - Lageado liso 220029; 7 – Lageado 220006; 8 – Palha murcha 790008; 9 – IAC-1278; Dobradinho 790054.	17
Figura 3. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPA-04. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na Tabela 4	19
Figura 4. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPA-07. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4	20
Figura 5. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPA-19. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.	21
Figura 6. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPD-10. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.	22
Figura 7. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPE-17. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.	23
Figura 8. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPH-05. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.	24
Figura 9. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPP-02. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.	25
Figura 10. Dendrograma de similaridade genética a partir dos produtos amplificados do DNA de 66 variedades de arroz por RAPD com base no coeficiente de similaridade de Jaccard.	27
Figura 11. Figura 11. Gráfico de Scores obtido através da análise de compontes principais (PCA, 5%): Mostra os agrupamentos das variedades por semelhança quanto aos parâmentos comprimento, largura, espessura (mm) e relação comprimento/largura. Três números consecutivos dentro dos grupos correspondem à indentificação de três repetições para cada variedade e não a valores para os parâmetros avaliados.....	31
Figura 12. Figura 12. Gráfico de Loadings obtido através da análise de compontes principais (PCA, 5%): Mostra a participação dos parâmentos comprimento, largura, espessura (mm) e relação comprimento/largura na formação dos agrupamentos no gráfico de Scores. Quanto mais próximo do ponto assinalado (+), maior é o valor para o parâmetro indicado.....	32

Figura 13. Depleção de $N-NO_3^-$ na solução nutritiva em decorrência da absorção por quatro variedades de arroz (IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga) submetidas a $0,2 \text{ mmol. L}^{-1}$ de $N-NO_3^-$, após passar por 72 horas em solução sem nitrogênio.....	34
Figura 14. Parâmetros cinéticos $V_{\text{máx}}$ e K_m de quatro variedades de arroz (IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga) submetidas a $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de $N-NO_3^-$, após passar por 72 horas em solução sem nitrogênio.....	35
Figura 15. Níveis de expressão relativa dos transportadores de nitrato <i>OsNRT2.1</i> , <i>OsNRT2.2</i> e <i>OsNRT1.1</i> nas raízes de quatro variedades de arroz e em três tempos após o fornecimento de $0,2 \text{ mM}$ de $N-NO_3^-$. Os níveis de expressão são relativos ao um gene controle (<i>OsAct</i>) e a plantas mantidas sem N. Nos insertos podem ser vistos detalhes dos gráficos em escala ampliada.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variedades locais (56) e melhoradas (dez) de arroz, número de acesso e origem quando conhecidos.....	10
Tabela 2. Iniciadores selecionados para a análise RAPD das variedades de arroz.....	11
Tabela 3. Sequências dos primers (forward e reverse) usados nas reações de PCR em tempo real para os genes dos transportadores de nitrato de arroz: OsNRT1.1, OsNRT2.1, OsNRT2.2 e do gene controle <i>OsAct</i> (actina).....	14
Tabela 4. Concentração e parâmetros de pureza do DNA extraído das variedades locais e melhoradas de arroz (Continua).....	15
Tabela 5. Primers utilizados para a construção do dendrograma de similaridade genética entre 66 variedades de arroz.....	17
Tabela 6. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do subgrupo I.1a do dendrograma de similaridade genética por RAPD.....	27
Tabela 7. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do subgrupo I.1b do dendrograma de similaridade genética por RAPD.....	28
Tabela 8. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do subgrupo I.2 do dendrograma de similaridade genética por RAPD.....	28
Tabela 9. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do Grupo II do dendrograma de similaridade genética por RAPD.....	29
Tabela 10. Valores médios de tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura e percentagem de proteína dos grãos com casca dos agrupamentos das variedades de arroz do dendrograma de similaridade genética por RAPD.....	29
Tabela 11. Variedades de arroz dos grupos 1, 2 e 3 obtidos através da análise dos componentes principais (ver figura 11, gráficos de scores).....	33
Tabela 12. Massa fresca (g/pote) da raiz e parte aérea e relação Raiz/parte aérea de quatro variedades de arroz (IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga) submetidas a 0,2 mmol L ⁻¹ de N-NO ₃ ⁻ , após passar por 72 horas em solução sem nitrogênio.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Avaliação da Similaridade Genética por RAPD	3
2.2 Proteína do Grão de Arroz	4
2.3 Absorção de Nitrato	5
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Obtenção do DNA Genômico das Variedades de Arroz	9
3.2 Seleção dos Primers e Reações de PCR-RAPD	11
3.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Absorção de Nitrato e Estudo da Expressão de NRTs na Faixa do Sistema de Transporte de Alta Afinidade	12
3.3.1 Montagem do experimento para os estudos cinéticos.....	12
3.3.2 Cinética de absorção.....	12
3.3.3 Cinética de expressão.....	13
3.3.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	13
3.3.3.2 Reações de PCR em tempo real.....	13
3.4 Avaliações do Teor de Proteína e Características Morfológicas dos Grãos das Variedades de Arroz	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Qualidade do DNA Extraído	15
4.2 DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD)	17
4.3 Dendrograma de Similaridade Genética	25
4.4 Tamanho dos Grãos e Proteína Bruta	27
4.5 Cinética de Absorção de Nitrato	34
4.6 Cinética de Expressão dos Transportadores de Nitrato	36
5 CONCLUSÕES	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oryza sativa* L.) é considerado alimento básico para mais da metade da população humana mundial especialmente para a população pobre em áreas rurais e centros urbanos de países em desenvolvimento da Ásia, da África e da América Latina (NGUYEN, 2004).

Dada a grande importância do arroz para a alimentação humana, faz-se necessária a realização de estudos para o aumento de sua produtividade bem como da elevação de seu teor de proteína visando à garantia da qualidade da alimentação, principalmente das pessoas sem poder aquisitivo para o consumo de outras fontes protéicas.

A grande demanda metabólica das plantas por nitrogênio associada à dinâmica da disponibilidade deste elemento fazem com que sua deficiência seja frequentemente o fator mais limitante à produtividade das culturas nos solos dos trópicos úmidos.

Dentre as plantas que recebem adubação nitrogenada, o maior requerimento é no caso dos cultivos para a produção de grãos (MENGEL *et al.* 2006). Entretanto, as plantas cultivadas são capazes de converter apenas de 30 a 40% do N aplicado em produtos de uso alimentício, tais como grãos (RAUN e JOHNSON, 1999).

Há estimativas de que entre 50-70% do nitrogênio aplicado não é recuperado pela cultura, resultando em perdas por lixiviação que colaboram para a contaminação dos lençóis freáticos e cursos de água, causando diversos problemas ambientais.

Além de elevar o custo da produção agrícola, os fertilizantes nitrogenados apresentam o agravante de que sua fabricação utiliza combustíveis fósseis, que contribuem para o aumento da emissão de CO₂ para a atmosfera, intensificando o efeito estufa e o aquecimento global.

Na série histórica dos índices de área plantada, produtividade e produção de arroz fornecida pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) o Estado do Maranhão aparece como o segundo maior produtor de arroz do Brasil (CONAB, 2009). No entanto, o mesmo apresenta índices muito abaixo do Estado do Rio Grande do Sul que aparece como maior produtor brasileiro. Além disso, as enormes variações que se observam no índice produtividade para o Estado do Maranhão revelam a grande suscetibilidade do seu sistema de produção de baixo insumo frente às condições climáticas.

No clima tropical úmido, caracterizado por uma estação que corresponde a um período de seca seguida de outra com grande intensidade de chuvas, tem-se um fluxo sazonal da disponibilidade de nitrogênio (WETSEELAR *et al.*, 1970) que constitui um fator agravante.

Devido à grande importância do arroz como alimento, seu cultivo em solos tropicais com baixa disponibilidade de nitrogênio leva a necessidade de se obter variedades que apresentem maior eficiência na absorção e uso deste elemento, em substituição ao uso intensivo de fertilizantes nitrogenados que oneram a produção e causam poluição de lençóis freáticos e cursos d'água.

Com relação aos estudos da eficiência de uso de N, o íon NO₃⁻ assume grande importância, pois em solos aerados, é a forma disponível para absorção pelas plantas na qual o nitrogênio predomina.

Levando-se em consideração que a capacidade de absorção de nitrato pela planta, seja um fator constituinte da sua eficiência no uso de nitrogênio, a caracterização dos parâmetros cinéticos da absorção deste íon, bem como o conhecimento dos genes e processos metabólicos envolvidos são de fundamental importância para a seleção de variedades adequadas aos diversos ambientes de cultivo, bem como para o uso em programas de melhoramento visando à obtenção de plantas mais eficientes no uso de nitrogênio.

A seleção das variedades para estudo deve também levar em consideração a similaridade genética do material, uma vez que a utilização de genótipos contrastantes pode levar a uma mais rápida identificação de distintos mecanismos de caráter genético.

A hipótese deste trabalho é que variedades de arroz geneticamente contrastantes apresentam variações na absorção e remobilização de N-NO_3^- que se refletem em maior eficiência de uso de nitrogênio

Os objetivos foram, portanto avaliar a similaridade genética de todas as variedades de arroz disponíveis no laboratório de nutrição mineral de plantas da UFRRJ utilizando a técnica de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) e determinar os parâmetros cinéticos da absorção de nitrato e a cinética de expressão de transportadores de nitrato em variedades geneticamente contrastantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Avaliação da Similaridade Genética por RAPD

Desde que foi apresentada em 1990 por WILLIAMS et al. (1990), a técnica de RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) tem sido muito aplicada em trabalhos de mapeamento genético e em estudos da estrutura e diversidade genética de populações.

Esta técnica baseia-se no emprego da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que neste caso, difere de uma PCR comum pela utilização de um único primer ao invés de um par em cada reação, e também pelo fato deste primer ser mais curto, geralmente apresentando dez nucleotídeos (Figura 1).



Figura 1. Esquema de amplificação de DNA utilizando-se um primer para RAPD de seqüência 5-ACGTAATCCG-3'. A – DNA genômico dupla fita; B – Anelamento do primer após desnaturação do DNA; C e D – Fragmentos de DNA formados ao final do 1º ciclo a partir de uma única dupla fita de DNA genômico.

O tamanho e a composição do primer de RAPD ($G+C \geq 50\%$) possibilitam a amplificação de um grande número de regiões ao longo do DNA em estudo.

Como esta técnica não utiliza um par de primers, a amplificação de um determinado fragmento depende que o mesmo iniciador encontre complementaridade de bases e se anele em sentidos opostos em ambas as fitas do DNA. Dessa forma, o comprimento de um fragmento amplificado dependerá da distância entre duas regiões de anelamento do primer nas fitas complementares do DNA.

O princípio da distinção de indivíduos por RAPD é que ao longo dos anos de evolução dos genótipos, a ocorrência de alterações em uma das regiões de anelamento do primer faz com que um determinado fragmento não possa mais ser amplificado; ou ainda, inserções ou deleções entre duas regiões de anelamento fazem com que o fragmento tenha seu tamanho alterado.

A técnica de RAPD é amplamente utilizada para a obtenção de “impressões digitais” genômicas de indivíduos, variedades e populações; análise da estrutura e diversidade genética em populações naturais, taxonomia moleculares, diagnósticos genéticos para o melhoramento de plantas e identificação de duplicatas em bancos de germoplasma, estabelecimento de relações filogenéticas entre espécies e a obtenção de dendrogramas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; GE et al., 1999; QIAN et al., 2001; VERMA et al., 1999; VIRK et al., 1994; XAVIER, 2000).

VERMA et al. (1999) através da técnica de RAPD, conseguiram diferenciar cultivares locais de arroz da Índia, enquanto ISHII (1996), estudando a divergência genética entre variedades de arroz na Ásia, conseguiu identificar o grau de parentesco e grupo precursor das espécies *Oryza sativa* e *Oryza glaberrima*.

Baseados na presença ou ausência de bandas de DNA obtidas por RAPD podem ser construídos dendrogramas que avaliam o grau de similaridade entre as espécies e suas relações intra e interespecíficas. Os métodos “Unweight Pair-group” (UPGMA) e NT (“Neighbor-Joining Pair-Group”) têm sido os mais utilizados nas análises de agrupamento. Por exemplo, MACKELL (1996) utilizou o método UPGMA-RAPD para diferenciar variedades de arroz oriundas do Japão e da Índia.

Estudos de variabilidade genética entre algumas variedades locais de arroz do Maranhão foram feitos por BAPTISTA (2002); ARAÚJO et al. (2003) e AREIAS et al. (2006) utilizando a técnica de RAPD. Essas variedades locais de arroz do Estado do Maranhão provavelmente passaram por processos intensos de adaptações ao clima tropical e a solos pobres em nutrientes. Vários autores (MENDONÇA, 1991; FERRAZ Jr. et al., 1997, SOUZA et al., 1993 e 1998; BAPTISTA, 2002; SANTOS et al., 2007 e 2009) destacam a relevância dessas variedades locais como importantes reservatórios genéticos para mecanismos de tolerância a estresses e eficiência do uso de nutrientes.

2.2 Proteína do Grão de Arroz

O arroz é consumido no Brasil por uma ampla parcela da população, principalmente a menos favorecida, que utiliza este cereal como alimentação básica e diária, e na maior parte das vezes como única fonte de proteína. Este fato justifica a procura por variedades de arroz com alto teor de proteína nos grãos, pois a proteína do grão de arroz é de melhor qualidade comparada com outros cereais (Juliano, 1980; Souza et al., 1993).

O uso de fertilizantes nitrogenados em épocas adequadas tem sido sugerido como uma possibilidade para o aumento dos teores de proteína dos grãos de arroz (SOUZA et al., 1993). No entanto, problemas relacionados ao custo dos fertilizantes e a poluição principalmente do lençol freático por nitrato (NO_3^-) têm levado à seleção de variedades que possam absorver e utilizar o nitrogênio (N) de forma mais eficiente (SOUZA et al., 1998, 1999).

De acordo com os trabalhos de GREENLAND (1958) e WETSELAAR (1961a, 1961b), o clima tropical, caracterizado por um período de chuvas e um período seco, como acontece no Maranhão, onde há cultivo de arroz pela população de baixa renda, ocasiona disponibilidade diferencial de nitrato no solo. Nas regiões do cerrado brasileiro esse fenômeno parece acontecer, com o acúmulo de nitrato no solo somente em curto período de tempo na estação chuvosa (NARDOTO e BUSTAMANTE, 2003). Desta forma, o N está sujeito à lixiviação intensa durante a estação das chuvas, tornando-se disponível para as plantas apenas no início do período úmido, portanto, devendo ser absorvido rapidamente.

Trabalhos com variedades locais de arroz indicam que estas variedades desenvolveram mecanismos que as tornaram mais eficientes no uso de nitrogênio em condições de baixa disponibilidade desse nutriente, resultando em produção de grãos e teores de proteína nos

grãos superiores aos encontrados nas variedades melhoradas (SOUZA et al., 1998; 1999; RODRIGUES et al., 2004).

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

Estes resultados indicam que variedades locais de arroz desenvolveram mecanismos que as tornaram mais eficientes na aquisição e uso deste nutriente, resultando em teores e qualidade de proteína nos grãos superiores aos encontrados nas variedades melhoradas. Portanto, se supõe que a maior eficiência dessas variedades esteja relacionada a mecanismos de absorção e assimilação de N. A absorção pelos transportadores de nitrato dos sistemas de alta e baixa afinidade bem como o uso do N se dariam de maneira mais eficiente para uma variedade local quando comparada à variedade melhorada (SOUZA et al., 1998).

2.3 Absorção de Nitrato

A absorção de nutrientes em termos de cinética enzimática foi descrita pela primeira vez por EPSTEIN e HAGEN (1952) a partir de estudos com potássio e rubídio radioativos.

De modo geral, a absorção de nutrientes pelas raízes frequentemente exhibe cinética similar à atividade de enzimas, variando em função da concentração de acordo com uma cinética de saturação. Portanto, a equação de Michaelis-Menten – que relaciona a taxa de catálise enzimática à concentração de substrato – bem como seus parâmetros $V_{\text{máx}}$ e K_m podem ser igualmente aplicados ao transporte de solutos (EPSTEIN e BLOOM, 2006) e da mesma forma que uma enzima apresenta um K_m – concentração do substrato em que se atinge metade da velocidade máxima de reação – que define a sua afinidade pelo substrato, os transportadores também o apresentam em relação ao íon transportado.

Desta forma, no caso da absorção de nutrientes, o K_m corresponde à concentração de um determinado nutriente em que se atinge metade da velocidade máxima de sua absorção pela planta, enquanto a $V_{\text{máx}}$ corresponde à máxima velocidade de absorção atingida numa concentração em que todos os transportadores do nutriente estejam saturados.

Junto à $V_{\text{máx}}$ e ao K_m , outro parâmetro, chamado concentração mínima ($C_{\text{mín}}$) também é utilizado para avaliar a absorção de nutrientes pelas plantas (COMETTI et al., 2006). O $C_{\text{mín}}$, por sua vez, é definido como a concentração do nutriente na qual a diferença entre as quantidades absorvida e extrusada pela planta é igual a zero, ou seja, o influxo líquido é igual à zero.

Até por volta de 1974, as taxas de absorção de nutrientes eram determinadas de duas maneiras. Em uma delas eram utilizadas raízes excisadas e um curto tempo de absorção, enquanto na outra, se utilizavam plantas intactas e longo tempo de absorção em soluções que eram mantidas a uma concentração constante por meio da reposição periódica do nutriente. Ambos os métodos somente podiam ser aplicados para íons dos quais se dispunha de um isótopo conveniente e exigiam que dados separados fossem obtidos para cada uma de uma série de concentrações do elemento em estudo, o que limitava o estudo da absorção de muitos nutrientes.

Visando contornar os inconvenientes dos métodos anteriores, CLAASSEN e BARBER (1974) desenvolveram um método baseado na taxa de depleção do íon a partir da solução nutritiva. Este método consistia em se medir a concentração do elemento na solução nutritiva em uma série de intervalos de tempo e utilizar os dados para a construção de uma curva.

Baseando-se no método de CLAASSEN e BARBER, RUIZ (1985) propôs um processo gráfico matemático para determinação dos parâmetros cinéticos e posteriormente, (RUIZ e FERNANDES FILHO 1992) desenvolveram o software “Cinética Win”, no qual dados obtidos em um experimento de cinética pelo método da depleção podem ser facilmente utilizados para gerar os parâmetros K_m e $V_{máx}$.

Atualmente, tanto o uso de isótopos radioativos quanto o método da depleção são empregados, sendo que no caso deste último, as taxas de influxos obtidas são freqüentemente referidas como taxas de influxo aparente ou absorção aparente.

Segundo alguns autores, a capacidade da planta em absorver rapidamente e acumular NO_3^- na fase inicial de desenvolvimento, propicia um maior estoque de N disponível para o metabolismo na fase de enchimento de grãos, podendo ser a razão de um maior acúmulo de N nos grãos (SOUZA et al., 1998; RODRIGUES et al., 2004; SANTOS et al., 2006). HIREL et al. (2001) sugerem que a formação de reserva de NO_3^- nos vacúolos é um fenômeno controlado geneticamente, e que pode ser de fundamental importância nas etapas posteriores de assimilação de N e produção de grãos. Portanto, supõe-se que no processo de seleção de plantas para maior eficiência de uso de N, deve-se optar por variedades que apresentem alta capacidade de acumular nitrato nos estágios iniciais de crescimento, de maneira que o NO_3^- acumulado nos vacúolos pudesse ser remobilizado, posteriormente, para a produção de grãos.

O influxo do íon NO_3^- nas células de raízes ocorre através de proteínas específicas presentes na plasmalema, denominadas transportadores e constitui um processo ativo, pois ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico. Para vencer o gradiente eletroquímico desfavorável, o influxo de cada íon NO_3^- está acoplado ao influxo de dois íons H^+ (cotransporte do tipo simporte), os quais têm influxo a favor de seu gradiente eletroquímico. A absorção de NO_3^- utiliza-se dessa forma, de uma força protomotriz que por sua vez é gerada pela atividade de proteínas também presentes na plasmalema denominadas $P-H^+-ATPases$, que bombeiam prótons para fora da célula consumindo energia na forma de ATP (FORDE, 2000; SOUZA e FERNANDES, 2006).

Os transportadores de NO_3^- são codificados por múltiplos genes, que apresentam expressão diferencialmente regulada, codificando proteínas com diferentes propriedades regulatórias e cinéticas (FORDE, 2000; ORSEL et al, 2002).

Para padronizar a nomenclatura dos genes que codificam transportadores em geral, normalmente adota-se para nomeá-los as duas letras iniciais correspondentes ao nome da espécie do organismo de origem, seguidas das iniciais da família de transportadores a que ele pertence e números correspondentes à seqüência cronológica de isolamento. Ex.: *AtNRT1.1* – primeiro gene identificado em *Arabidopsis thaliana* que codifica um transportador de nitrato (Nitrate transporter).

De acordo com a afinidade dos transportadores pelo NO_3^- , os mesmos constituem dois sistemas de transporte; sendo um deles conhecido como sistema de transporte de baixa afinidade (LATS – “*low affinity transport system*”), cujas proteínas são codificadas por uma família de genes representada pela nomenclatura NRT1; e outro denominado sistema de transporte de alta afinidade (HATS- “*high affinity transport system*”), codificado por genes da família NRT2 (FORD et al, 2000). Dessa forma, no caso específico dos transportadores de nitrato, a ordem cronológica de isolamento passou a ser identificada por um segundo algarismo, uma vez que o primeiro foi destinado à identificação dos grupos LATS representado pelo número 1 e HATS representado pelo número 2.

Em *Arabidopsis thaliana* são conhecidos sete genes da família NRT2 (FILLEUR e DANIEL-VEDELE, 1999; ZHUO et al., 1999 e ORSEL et al., 2002). No genoma do arroz (*Oryza sativa* L. cv. Nipponbare) foram identificados quatro membros dessa família (NRT2.1, NRT2.2, NRT2.3 e NRT2.4) (ARAKI e HASEGAWA, 2006) e estima-se que existam mais de uma dezena de genes NRT2 em cevada (TRUEMAN et al., 1996 e VIDMAR et al., 2000).

Alguns transportadores de NO_3^- do sistema de transporte de alta afinidade (NRT2) são codificados por genes constantemente expressos (sistema de alta afinidade constitutivo, cHATS); enquanto outros são passíveis de indução pelo próprio NO_3^- (sistema de transporte de alta afinidade induzido, iHATS). Da mesma forma, o LATS também pode apresentar cLATS e iLATS (Glass et al., 2001). O sistema de transporte de alta afinidade (saturável) permite à planta, absorver o NO_3^- em baixas concentrações externas ($1\mu\text{M}$ a 1mM), sendo que o iHATS é induzido pelo NO_3^- no meio externo enquanto que o cHATS está igualmente presente em plantas que não foram previamente supridas com NO_3^- (ORSEL et al., 2002; MILLER et al., 2007). O LATS por sua vez assume importância somente sob concentrações externas de nitrato mais elevadas, sendo que a concentração de 1mM de nitrato é normalmente utilizada para separar as faixas de atuação dos dois sistemas de transporte.

Os transportadores de nitrato que atuam no sistema de alta afinidade, codificados pelos genes da família NRT2, pertencem à grande família de proteínas chamada NNP (“nitrate-nitrite porter” – transportadores de nitrato-nitrito).

Os transportadores de NO_3^- do sistema de baixa afinidade, codificados pelos genes da família NRT1, pertencem a grande família de proteínas chamada PTR (“peptide transporter” – transportador de peptídeo). Esta família de transportadores é reconhecida pela capacidade de seus membros transportarem uma variedade de substratos (oligopeptídeos, aminoácidos, NO_3^- , ClO_3^-) e pela capacidade dos transportadores lidarem com substratos de diferentes tamanhos e cargas (FORDE, 2000). Isto foi demonstrado em experimento com *Brassica napus*, no qual um transportador do sistema de baixa afinidade foi capaz de transportar histidina, além de nitrato (ZHOU et al., 1998). Membros dessa família também foram clonados em arroz (OsNRT1). O OsNRT1 é codificado por um gene específico em raízes, não havendo expressão do mesmo na parte aérea. O NRT1.1 é um transportador constitutivo que diferentemente dos demais transportadores tem a capacidade de atuar tanto na faixa de alta quanto de baixa afinidade além de ser importante na sinalização pelo nitrato, permitindo à planta reconhecer a presença deste íon para a indução de outros genes (HO et al., 2009).

RICHARD-MOLARD et al. (2008) observaram que o prévio acúmulo de N, devido à maior capacidade de absorção de NO_3^- , associada a uma maior expressão dos genes AtNRT1.1, AtNRT2.1 e AtNRT2.4 - possibilitou que duas linhagens de *Arabidopsis thaliana* diferissem quanto à produção de biomassa de parte aérea e raízes quando submetidas a um mesmo período de fome nitrato.

GALLAIS e HIREL (2004) enfatizaram que em milho sob alto nível de fertilização nitrogenada, a eficiência foi explicada pela variação da capacidade de absorção de N, enquanto sob baixo nível de fertilização, esta foi atribuída à variação da eficiência na utilização de N.

SANTOS et al. (2007) constataram que a variedade de arroz Piauí (local) foi mais eficiente que a variedade IAC-47 (melhorada) na absorção e uso de N, acumulando mais NO_3^- em seus tecidos na fase inicial do ciclo.

Resultados de FERRAZ JR. et al. (2001) e SOUZA et al. (1998, 2002) mostraram que para variedades locais de arroz as maiores eficiências de uso de N para produzir grãos foram obtidas em função da alta eficiência de utilização do N anteriormente absorvido, enquanto para as variedades melhoradas o principal responsável pelas altas eficiências foi a absorção de N recém fornecido através de suplementação na antese. Estes resultados podem ser atribuídos a que as variedades melhoradas foram selecionadas para altas produções em condições de alta disponibilidade de N, sem haver pressão de seleção para a maior eficiência de utilização do N absorvido. Por outro lado, as variedades locais por terem sido, ao longo dos anos, submetidas, pelos agricultores, a cultivos em solos de baixa fertilidade natural utilizam melhor o N disponível no momento, armazenando-o para etapas posteriores.

Deste modo o aumento na eficiência de utilização do nitrogênio, particularmente pelo arroz, através do melhor uso do nitrato fornecido, pode ser elucidada, a partir do conhecimento da cinética de absorção desse íon, como também pela identificação dos genes envolvidos neste processo.

Estudos para avaliar a contribuição de um determinado transportador na absorção de nitrato por uma planta têm utilizado comparar níveis de expressão com taxas de absorção e/ou status metabólico. Uma abordagem mais recente foi a de determinar a cinética de expressão destes transportadores a partir da indução por diferentes concentrações de nitrato (HO, 2009). A aplicação desta nova abordagem se mostra interessante, pois permite avaliar a expressão de transportadores NRT induzíveis por nitrato em resposta a diferentes níveis de ressurgimento do nutriente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do DNA Genômico das Variedades de Arroz

Quinze sementes de cada uma de 66 variedades arroz, incluindo variedades locais e melhoradas importadas ou nacionais (Tabela 1) foram desinfestadas por agitação em solução de hipoclorito de sódio 2 a 3% durante 15 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas sobre duas camadas de gaze presas por um elástico à boca de um copo plástico que por sua vez, foi posto dentro de um segundo copo de maior volume. Ao interior do copo menor e ao espaço entre as paredes dos copos foi adicionada água destilada de modo que o copo menor com as sementes flutuasse dentro do maior e as sementes se mantivessem em contato constante com um filme de água.

Após a semeadura em água, os copos com as sementes foram levados para câmara de crescimento [fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro), luminosidade de $280 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna)] localizada no Departamento de solos da UFRRJ. Após a germinação, as plântulas com idade de cinco dias tiveram a parte aérea coletada, embalada em papel alumínio e imediatamente congelada em nitrogênio líquido. Após o rápido congelamento, o material foi armazenado em freezer a -80 °C para posterior extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada segundo a metodologia descrita por FERREIRA e GRATTAPAGLIA (1998) com adaptações, onde, para cada variedade, 150 mg de tecido vegetal foram triturados em N₂ líquido dentro de um grau (almofariz) até que o material ficou pulverizado. Em seguida, parte do material foi transferida para um microtubo ao qual foram adicionados 700 μL de solução tampão de extração (2% de CTAB, 1,4 mM de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM TRIS-HCl e 1% de mercaptoetanol). A mistura foi homogeneizada agitando-se por inversão durante 20 vezes e incubada em banho-maria a 65 °C por tempo mínimo de 30 e máximo de 60 minutos. Durante a incubação os tubos foram agitados a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão.

Foram feitas duas partições com solvente orgânico. Na primeira, foram adicionados 600 μL de CIA (Clorofórmio - álcool isoamílico 24:1) sendo a mistura homogeneizada por agitação durante 5 minutos, invertendo-se os tubos no mínimo 20 vezes ou até que se formasse uma emulsão homogênea. Em seguida, a emulsão foi centrifugada à 16000g durante 5 minutos e em seguida, 510 μL da fase superior (aquosa) foram transferidos para novo tubo.

No novo tubo com a fase aquosa, foram adicionados 50 μL de solução de 10% de CTAB e 1,4 M NaCl. A mistura foi homogeneizada por inversão do tubo e em seguida realizou-se a segunda partição com 600 μL de CIA (da mesma forma que a primeira). Após a segunda centrifugação, 420 μL da fase aquosa foram transferidos para novo microtubo ao qual foram adicionados 280 μL de isopropanol frio (-20°C). A mistura foi homogeneizada através de suaves inversões e em seguida, posta no freezer a -20 °C para precipitar os ácidos nucleicos. Após este período foi realizada uma nova centrifugação a 3300 x g por cinco minutos, sendo o sobrenadante descartado ao final. O pellet formado no fundo do microtubo foi lavado 3 vezes, sendo as duas primeiras lavagens em 1mL de etanol 70%, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos em cada lavagem e a terceira em 1 mL de etanol 95% ou absoluto durante 2 a 3 minutos. Após a última lavagem o álcool foi descartado e o microtubo contendo o pellet foi submetido a uma centrifugação a vácuo durante 3 minutos em um evaporador para secagem do DNA. Após a secagem o DNA foi ressuspense em 50 μL de tampão TE com 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de RNase e incubado a 37°C por 40 minutos para degradação de RNA.

Tabela 1. Variedades locais (56) e melhoradas (dez) de arroz, número de acesso e origem quando conhecidos.

Variedades	Acesso	Origem	Variedades	Acesso	Origem
Agulhinha Branco-ar		Arari-MA	Pingo d'água-48	790148	
Agulhinha vermelho-ar		Arari-MA	Rabo de Burro	790006	
Zebu branco-vi		Viana-MA	Come cru vermelho-34	790034	
Lageado-arari		Arari-MA	Palha murcha-08	790008	
Agulhinha branco-vm		Vitória do Mearim – MA	Agulha	790057	
Cana roxa		Viana-MA	Goiano	780165	
Arroz 70		Vitória do Mearim-MA	Lageado-18	840118	
Braquiária		Vitória do Mearim-MA	IAC-25*	2020	
Cutião		Viana-MA	Ligeiro	790102	
Manteiga		Penalva-MA	Sagrimão	790138	
Zebu branco-pe		Penalva-MA	Bico Ganga	790180	
Rabo de burro-pe		Penalva-MA	Comum branco	790160	
Cheque-cheque		Penalva-MA	IAC-1278*		IAC-SP
Canela de Ferro-mn		Miranda do Norte-MA	Dobradinho	790054	
Pingo d'água-vi		Viana-MA	Ligeiro vermelho	790052	
Bacabinha		Vitória do Mearim – MA	Zebu branco-21	790121	
Zebu branco		Vitória do Mearim – MA	Arroz de revenda	790088	
Lageado liso		Vitória do Mearim-MA	Zebu	790028	
Três meses		Vitória do Mearim – MA	IR-08*		Filipinas
Palha murcha-pe		Penalva-MA	Três meses anã		
Nipponbare		Japão	Lageado		
Vermelho 01			Bonanza		
Lageado sem pêlo	220018		Come cru vermelho		
Vermelho 03			IAC-202*		IAC-SP
Agulhinha vermelho			IAC-47*		IAC-SP
Lageado-01	790001		Dourado Precoce		
Lageado liso-29	220029		IAC-4440*		IAC-SP
Bacabinha-57	790157		IAC-600*		IAC
Jatobá	790165		Espadão	IN-24	
Bacaba	790098		SBT-33(aromático)*		
Bacabinha-27	220027		Arariba (Alagado)		Arari-MA
Canela de Ferro-64	790164		Dongjin*		Coréia
Lageado-06	220006		Piauí		

*Variedades melhoradas

(Variedades provenientes de trabalhos de SOUZA et al. (1998), FERRAZ JR et al. (2001) e ARAUJO et al. (2002), AREIAS et al. (2006) e SANTOS et al. (2007) ou oriundas do CENARGEM, do CNPAF ou coletadas no Estado do Maranhão (MA), e que apresentam ou não número de acesso do banco ativo de germoplasma, BAG).

Após o tratamento com RNase, amostras de 2µl do DNA de cada uma das variedades foram utilizadas para quantificação e avaliação da pureza em espectrofotômetro tipo nanodrop; e por fim uma alíquota, conforme a concentração determinada, foi utilizada para diluição em TE 1X, para obter a solução de trabalho na concentração de 12,5 ng. µL⁻¹

3.2 Seleção dos Primers e Reações de PCR-RAPD

A partir dos trabalhos de BAPTISTA (2002); BHUYAN et al. (2007) e RABBANI et al. (2008) sobre análises RAPD em arroz, foram identificados 50 primers (iniciadores), os quais foram classificados em ordem decrescente do número de bandas polimórficas que amplificaram quando anteriormente utilizados. Em seguida, foram selecionados os 26 que apresentaram maior número de bandas polimórficas (Tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores selecionados para a análise RAPD das variedades de arroz.

Código	Seqüências dos iniciadores	Referencia
OPB - 17	5'-AGGGAACGAG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA - 17	5'-GACCGCTTGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA - 19	5'-CAAACGTCGG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE - 17	5'-CTACTGCCGT-3'	BAPTISTA et al (2002)
OPA - 20	5'-GTTGCGATCC-3'	RABBANI et al. (2008)
OPB - 08	5'-GTCCACACGG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA - 18	5'-AGGTGACCGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA - 08	5'-GTGACGTAGG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE - 19	5'-ACGGCGTATG-3'	BAPTISTA et al (2002)
OPD - 18	5'-GAGAGCCAAC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPL - 16	5'-AGGTTGCAGG-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPB - 11	5'-GTAGACCCGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE - 18	5'-GGACTGCAGA-3'	BAPTISTA et al (2002)
OPD - 10	5'-GGTCTACACC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPH - 05	5'-AGTCGTCCCC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPP - 02	5'-TCGGCACGCA-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPA - 04	5'-AATCGGGCTG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA - 07	5'-GAAACGGGTG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPB - 07	5'-GGTGACGCAG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE - 20	5'-AACGGTGACC-3'	BAPTISTA et al (2002)
OPH - 08	5'-GAAACACCCC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPB - 13	5'-TTCCCCCGCT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA - 09	5'-GGGTAACGCC-3'	RABBANI et al. (2008)
OPB - 18	5'-CCACAGCAGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE - 07	5'-AGATGCAGCC-3'	BAPTISTA et al (2002)
OPB - 10	5'-CTGCTGGGAC-3'	BHUYAN et al. (2007)

As condições das reações de PCR foram determinadas com base nos trabalhos de BAPTISTA (2002); ARAÚJO et al. (2003) e AREIAS et al. (2006); BHUYAN et al. (2007) e RABBANI et al. (2008) sobre RAPD em arroz, sendo utilizado um volume final de 20 µL, contendo 25 ng de DNA genômico, 2,3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de primer, uma unidade de Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen) e 2 µL do tampão da enzima, sendo o volume final completado com água ultra pura (Invitrogen). As condições de temperatura foram 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 35°C por 1 minuto (anelamento), 72°C por 2 minutos (extensão) e mais 5 minutos a 72°C ao final do último ciclo para extensão final.

Para testar as condições de temperatura e as concentrações de reagentes para a PCR, bem como confirmar a qualidade do DNA obtido, foi realizada uma PCR teste onde se utilizou o primer OPA-07 (escolhido ao acaso entre os primers previamente selecionados) e DNAs de 10 variedades de arroz tomadas ao acaso entre as variedades a serem submetidas à análise de similaridade genética.

Depois de testadas as condições pré-estabelecidas, deu-se continuidade as reações; cujos produtos foram revelados por separação através de eletroforese em gel de agarose 1,5 %, com tampão TBE ½ X por duas horas a 100 V e posterior coração em solução de brometo

de etídeo $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. As imagens dos géis foram capturadas em sistema de fotodocumentação U/V White Darkroom e analisadas no software GelCompar II no qual foi gerado um dendrograma de similaridade genética utilizando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard (1976).

3.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos da Absorção de Nitrato e Estudo da Expressão de NRTs na Faixa do Sistema de Transporte de Alta Afinidade

Para o estudo da cinética de absorção de NO_3^- e avaliação da expressão gênica de transportadores de nitrato de alta afinidade, quatro variedades locais de arroz Bico Ganga, Arroz de Revenda e Manteiga e uma melhorada (IAC-47) foram selecionadas a partir de grupos geneticamente contrastantes no dendrograma de similaridade genética obtido pela técnica de RAPD e levando-se em consideração os teores de proteína bruta dos grãos.

3.3.1 Montagem do experimento para os estudos cinéticos

Trezentas sementes de cada uma das quatro variedades de arroz (IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga) foram desinfestadas e postas para germinar em água destilada conforme descrito no item 3.1, em câmara de crescimento.

Aos quatorze dias da semeadura, quando todas as sementes viáveis já haviam germinado e as plântulas apresentavam cerca de 10 cm, realizou-se uma seleção de plântulas levando-se em consideração a uniformidade de desenvolvimento do sistema radicular e da parte aérea dentro de cada variedade.

As plântulas selecionadas foram transferidas para potes plásticos com capacidade de 700 mL contendo 600 mL de solução nutritiva com 2 mM de N-NO_3^- e os demais nutrientes a $\frac{1}{4}$ da força iônica (FI) da solução de Hoagland e Arnon (1950). Em cada pote foram colocadas quatro plantas, e para cada variedade quatro repetições, sendo cada pote uma repetição.

A solução nutritiva foi trocada periodicamente, sendo as duas primeiras trocas espaçadas a cada quatro dias e as demais a cada três dias. A partir da primeira troca de solução a concentração de NO_3^- foi mantida enquanto a dos demais nutrientes foi aumentada para $\frac{1}{2}$ FI.

Aos 30 dias após a germinação, as plantas receberam nova solução nutritiva sem nitrogênio e demais nutrientes a $\frac{1}{2}$ FI, constituindo-se um período de deficiência de N. Após 72 horas nesta solução sem N, um grupo de plantas recebeu nova solução contendo 0,2 mM de NO_3^- (ressuprimento) enquanto outro grupo foi mantido em solução sem nitrogênio.

3.3.2 Cinética de absorção

Para a avaliação da cinética de absorção foram separados quatro potes de cada variedade, após o ressuprimento do nitrogênio, dos quais alíquotas de 1,5 mL de solução nutritiva foram coletadas na ocasião do ressuprimento de N (tempo zero) e a cada 30 minutos nas primeiras três horas e a cada uma 60 minutos nas horas seguintes até o esgotamento dos íons nitrato na solução.

Os teores de N-NO_3^- nas amostras coletadas de solução nutritiva foram dosados segundo de CATALDO *et al.* (1975) e utilizados para as determinações dos parâmetros cinéticos de absorção (K_M e $V_{m\acute{a}x}$) empregando-se o processo gráfico-matemático proposto por Ruiz (1985) (programa Cinética – Ruiz e Fernandes, 2006), a partir do método proposto por CLAASSEN e BARBER (1974), que se baseia na velocidade de esgotamento do íon na solução nutritiva. Através desse método é possível estabelecer a curva de absorção com base na concentração do íon na solução ao longo do tempo de absorção através de ajustes de função matemática aos dados experimentais.

3.3.3 Cinética de expressão

Para a avaliação da cinética de expressão dos transportadores de nitrato, raízes de plantas que permaneceram sem N e de plantas que receberam 0,2 mM de N-NO_3^- foram coletadas às três, seis e nove horas após o ressuprimento de nitrogênio. No momento da coleta amostras de raízes foram rapidamente separadas, embaladas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o momento de extração do RNA.

3.3.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído segundo metodologia de GAO et al. (2001) utilizando tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS). Amostras de raízes foram maceradas em N_2 e homogeneizadas em uma mistura contendo 4,5 ml de tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS) e 3 ml de solução fenol:clorofórmio (1:1). Após centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O RNA foi precipitado pela adição de 1/10 volume de 2 M acetato de sódio pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) e 1 volume de isopropanol puro gelado. A seguir a mistura foi mantida a -20°C por 2 horas seguida de centrifugação a 12.000g por 10 min. O precipitado foi solubilizado em 2,5 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e precipitado novamente pela adição de 2,5 mL de 4 M cloreto de lítio pH 4,8 ($\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$). Após centrifugadas a 12.000g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 0,1 mL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$.

A qualidade do RNA extraído foi verificada espectrofotometricamente por meio das relações A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} e visualização em gel de agarose (1%) com brometo de etídio. As amostras de RNA total utilizadas nas reações de síntese do cDNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante.

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

3.3.3.2 Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, de acordo com as recomendações do fabricante: 3 μL da mistura de “primers” “forward” + “reverse” 3,6 μM ; 6 μL de “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems)” e 3 μL da reação de síntese de cDNA. A mistura foi agitada por dois minutos em agitador de placas, centrifugada a 4000 rpm por quatro minutos e levada para o aparelho de PCR em tempo real (“Step One Plus Real Time PCR System” da Applied Biosystems). Os primers para os genes estudados que codificam os transportadores de nitrato foram desenhados utilizando-se o programa “Primer Express version 2.0” (Applied Biosystems), as seqüências são apresentadas na tabela 3. O gene da actina de arroz foi utilizado como controle constitutivo. Os produtos da PCR foram detectados com “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems).

Tabela 3. Sequências dos primers (“forward e reverse”) usados nas reações de PCR em tempo real para os genes dos transportadores de nitrato de arroz: *OsNRT1.1*, *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e do gene controle *OsAct* (actina)

Gene	“Primer Forward”	“Primer Reverse”	Acesso NCBI
<i>OsNRT1.1</i>	5'-CGAGGTTGGTGCATTTTGTG	5'-GCCGTGGTGTCTCTTTTTTTTT	NM_001067555.1
<i>OsNRT2.1</i>	5'-GCGACCGAGACCAGCAATAC	5'-TTCATCACCGTTTGCAACAAG	NM_001052193.1
<i>OsNRT2.2</i>	5'-GCCGGAGCACGCCTAAT	5'-AAACGGTAACAAAACGTTCAACAG	NM_001052194.1
<i>OsAct</i>	5'CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA	5'CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA	NM_001057621.1

Os valores da C_T (*cycle threshold*) ou ciclo limite, que corresponde ao número de ciclos da PCR em tempo real no qual um sinal fluorescente é detectado, acima da fluorescência de fundo e, exatamente, na fase exponencial da reação (POLANCZYK et al., 2004) foram obtidos utilizando-se a plataforma *StepOne Software v2.1* da *Applied Biosystems*, Com base nos valores de C_T , relativo ao genes constitutivo e os genes alvo de estudo, e utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001), foram calculados os valores de expressão dos genes. Como controle da reação para cada variedade de arroz foi utilizado o respectivo tratamento sem nitrogênio, em cada tempo de coleta (três, seis e nove horas).

3.4. Avaliações do Teor de Proteína e Características Morfológicas dos Grãos das Variedades de Arroz

O N-total dos grãos das variedades de arroz utilizadas foi determinado pelo método Kjeldahl, utilizando-se digestão sulfúrica, destilação e titulação (TEDESCO, 1998). A percentagem de proteína bruta dos grãos foi obtida multiplicando-se o N-total (N-Kjeldahl), por 5,95 (JULIANO e BECHTEL, 1985).

O comprimento, a largura e a espessura dos grãos de arroz das 66 variedades estudadas foram mensurados com um paquímetro digital (médias de seis repetições em triplicata, por variedade de arroz) segundo recomendações de AREIAS et al. (2006) e determinou-se a relação comprimento largura (C/L) e espessura/largura (E/L).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Qualidade do DNA Extraído

Os valores para as razões de absorvâncias nos comprimentos de ondas 260/280 e 260/230 (Tabela 4) revelaram índices de pureza adequados no que se refere a contaminações por carboidratos e proteínas respectivamente.

Tabela 4. Concentração e parâmetros de pureza do DNA extraído das variedades locais e melhoradas de arroz. (Continua)

Variedades	Concentração ng/μL	Razão 260/280 nm	Razão 260/230 nm	NCL
Agulhinha Branco-ar	744,47	2,00	2,19	1
Agulhinha vermelho-ar	263,52	2,02	2,35	2
Zebu branco - vi	529,88	1,98	2,30	3
Lageado-arari	451,41	1,99	2,34	4
Agulhinha branco-vm	362,67	2,00	2,35	5
Cana roxa	233,27	2,00	2,26	6
Arroz 70	527,71	1,96	2,29	7
Braquiária	1237,39	2,03	1,97	8
Cutião	384,51	2,00	2,31	9
Manteiga	647,39	1,98	2,17	10
Zebu branco-pe	710,19	1,99	2,14	11
Rabo de burro-pe	437,47	1,99	2,29	12
Cheque-cheque	873,81	2,00	2,20	13
Canela de Ferro-mn	957,55	2,02	2,10	14
Pingo d'água-vi	554,00	1,97	2,28	15
Bacabinha	449,35	1,99	2,22	16
Zebu branco	498,69	1,99	2,31	17
Lageado liso	744,93	1,99	2,16	18
Três meses	284,20	2,04	2,00	19
Palha murcha-pe	413,57	1,99	2,31	20
Nipponbare	732,50	2,63	1,87	21
Vermelho 01	713,67	1,98	2,10	22
Lageado sem pêlo	409,87	1,99	2,37	23
Vermelho 03	875,21	2,00	2,24	24
Agulhinha vermelho	1242,82	2,00	2,26	25
Lageado-01	663,91	1,98	2,21	26
Lageado liso-29	287,07	1,99	2,36	27
Bacabinha-57	603,22	2,00	2,24	28
Jatobá	492,49	1,99	2,32	29
Bacaba	619,99	2,00	2,18	30
Bacabinha-27	879,59	2,01	2,16	31
Canela de Ferro-64	1281,03	2,02	2,11	32
Lageado-06	889,57	2,00	2,18	33
Pingo d'água-48	943,79	1,99	2,29	34
Rabo de Burro	625,70	1,99	2,14	35
Come cru vermelho-34	716,10	1,98	2,16	36
Palha murcha-08	121,87	2,01	2,20	37
Agulha	513,34	1,98	2,35	38
Goiano	499,11	1,98	2,33	39
Lageado-18	402,96	1,99	2,32	40
IAC-25*	592,92	1,95	2,27	41

Tabela 1. Continuação

Ligeiro	678,06	1,98	2,20	42
Sagrimão	526,29	1,98	2,31	43
Bico Ganga	782,71	1,98	2,25	44
Comum branco	1081,28	1,99	2,29	45
IAC-1278*	507,94	1,98	2,36	46
Dobradinho	728,26	1,99	2,18	47
Ligeiro vermelho	823,21	1,98	2,17	48
Zebu branco-21	552,67	1,96	2,34	49
Arroz de revenda	234,60	2,01	2,30	50
Zebu	654,06	1,98	2,14	51
IR-08*	509,72	1,99	2,31	52
Três meses anã	569,35	1,96	2,28	53
Lageado	558,44	1,97	2,29	54
Bonanza	530,09	1,96	2,30	55
Come cru vermelho	453,34	1,99	2,30	56
IAC-202*	765,88	2,01	2,22	57
IAC-47*	337,90	2,00	2,30	58
Dourado Precoces	542,82	1,97	2,29	59
IAC-4440*	660,51	1,98	2,14	60
IAC-600*	735,58	1,99	2,21	61
Espadão	617,74	1,99	2,20	62
SBT-33(aromático)*	491,28	1,97	2,28	63
Arariba (Alagado)	284,66	1,99	2,29	64
Dongjin*	715,00	2,28	1,64	65
Piauí	915,00	2,47	1,56	66

* - Variedades melhoradas; NCL - número de controle de laboratório

O padrão e a intensidade das bandas observadas na PCR teste (Figura 2) também revelaram boas condições para a reação.

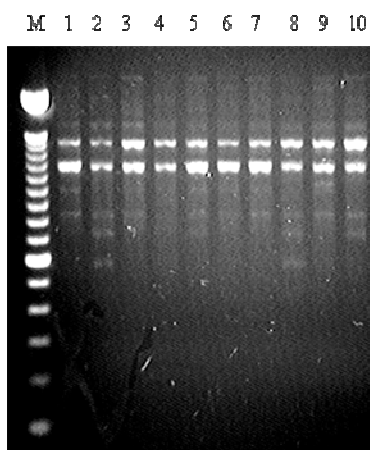


Figura 2. Bandas geradas pela amplificação de DNA de variedades de arroz (1 a 10) com o primer OPA-07. As colunas representam: M – Marcador 100 bp DNA Ladder, 1- Lageado (Arari-MA); 2 – Braquiária (Vitória do Mearim-MA); 3 – Lageado liso (Vitória do Mearim-MA); 4 – Vermelho 1; 5 – Lageado sem pêlo 220018; 6 - Lageado liso 220029; 7 – Lageado 220006; 8 – Palha murcha 790008; 9 – IAC-1278; Dobradinho 790054.

4.2 DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD)

Embora as condições para a reação tenham se mostrado satisfatórias na reação teste, as reações definitivas com 14 dos 26 primers utilizados apresentaram amplificação de bandas no controle negativo. Foram realizados sucessivos testes para identificação da fonte de contaminação, e por fim, a total substituição dos materiais e reagentes; todavia, sem sucesso.

A literatura referente à técnica de RAPD se refere a esta ocorrência como não sendo motivo de alarde, uma vez que as bandas amplificadas a partir do DNA contaminante não coincidem com bandas amplificadas a partir do DNA em estudo. Supõe-se uma provável contaminação da enzima taq DNA polimerase com DNA da bactéria *Echerichia coli* na qual esta enzima é produzida em sistema heterólogo para posterior extração e purificação.

Portanto, embora haja indicações de que esta contaminação no controle negativo possa ser ignorada, optou-se por não utilizar os primers que produziram tais bandas inesperadas.

Desta forma, apenas sete dos 26 primers inicialmente selecionados foram efetivamente utilizados para a construção do dendrograma (Tabela 5).

Tabela 5. Primers utilizados para a construção do dendrograma de similaridade genética entre 66 variedades de arroz.

Nome	Sequência
OPA – 04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA – 07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA – 19	5'-CAAACGTCCG-3'
OPD – 10	5'-GGTCTACACC-3'
OPE – 17	5'-CTACTGCCGT-3'
OPH – 05	5'-AGTCGTCCCC-3'
OPP – 02	5'-TCGGCACGCA-3'

Nas figuras 3 a 9 são apresentados os perfis de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com os primers da tabela 5.

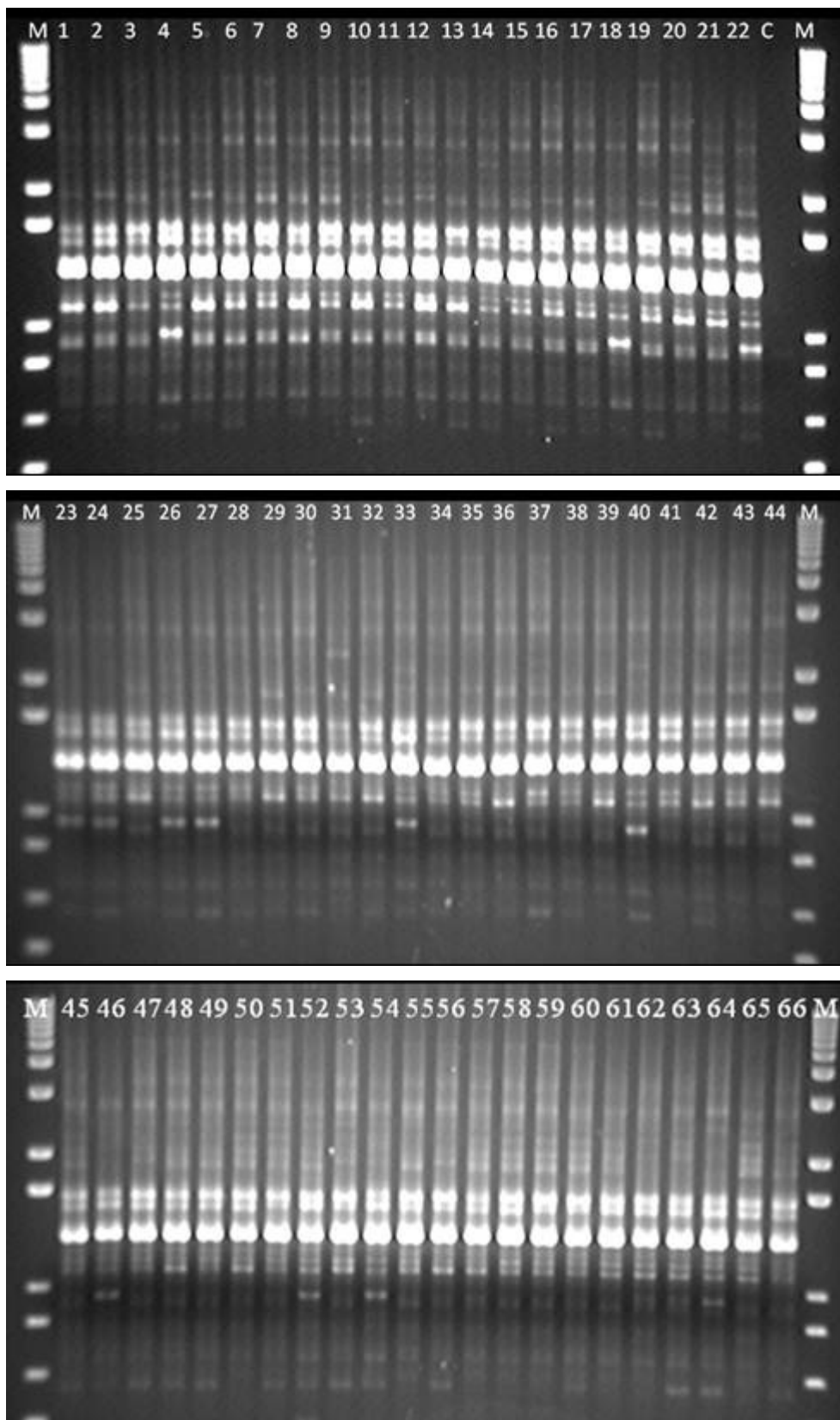


Figura 3. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPA-04. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na Tabela 4.

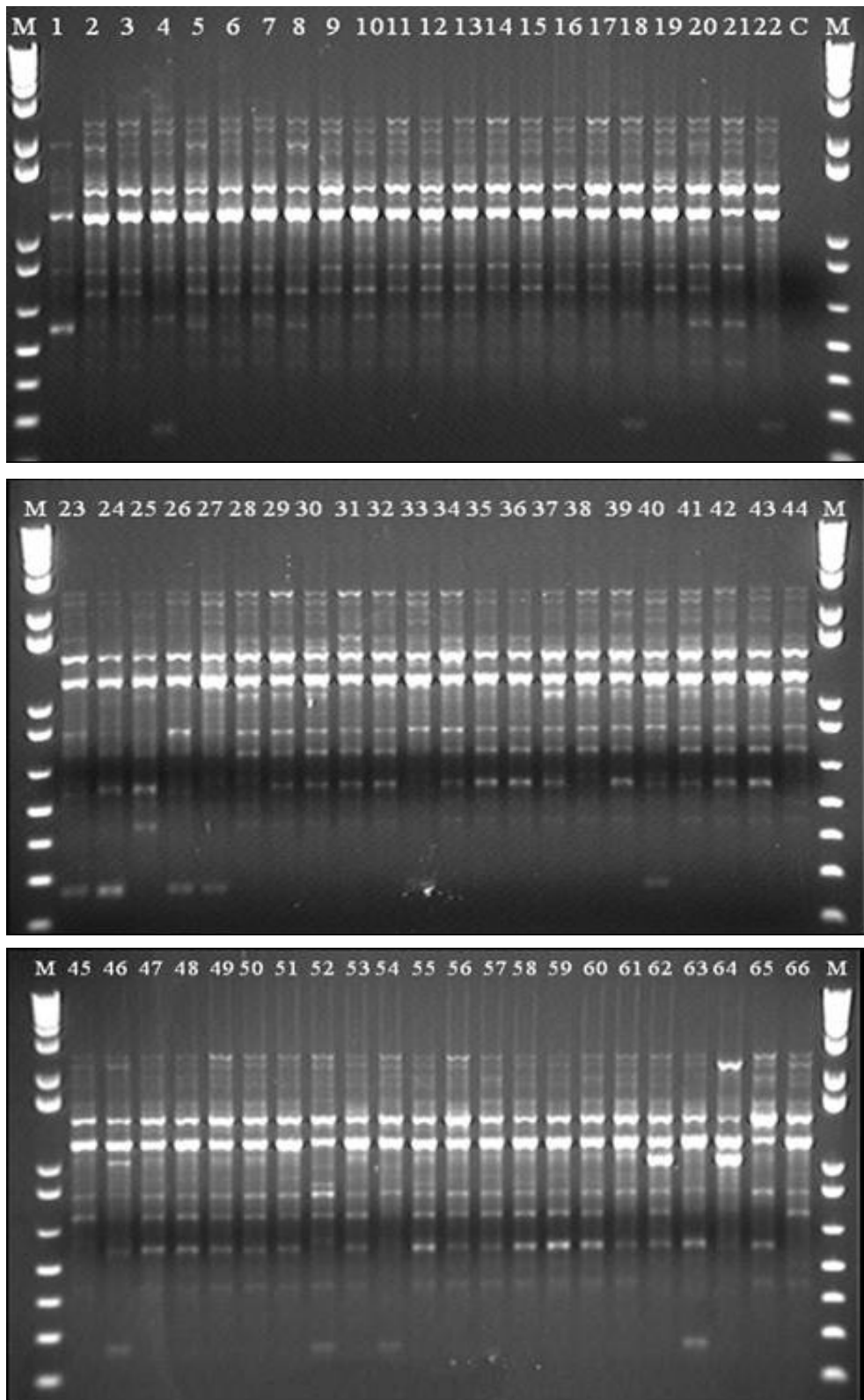


Figura 4. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPA-07. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.

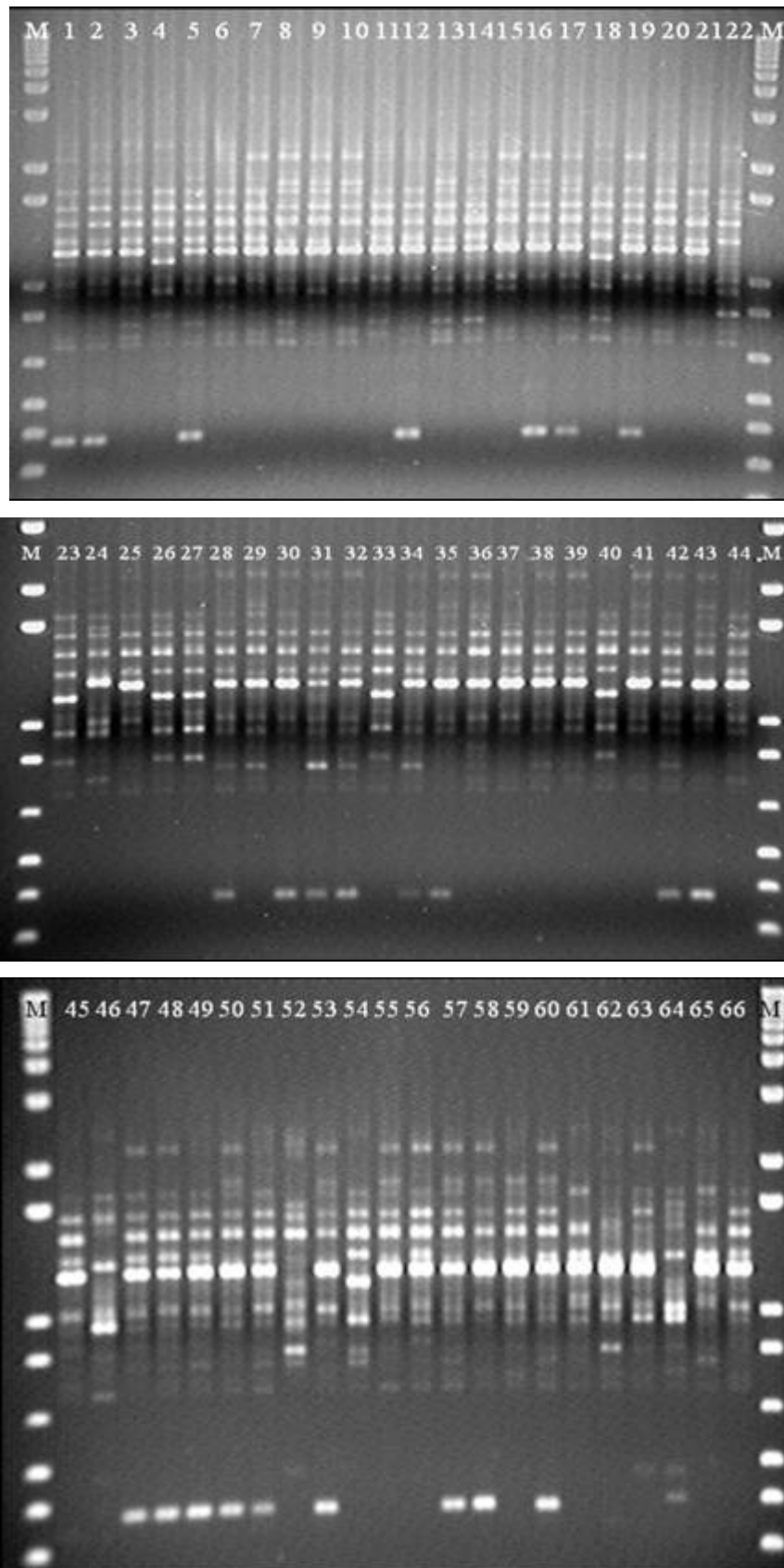


Figura 5. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPA-19. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.

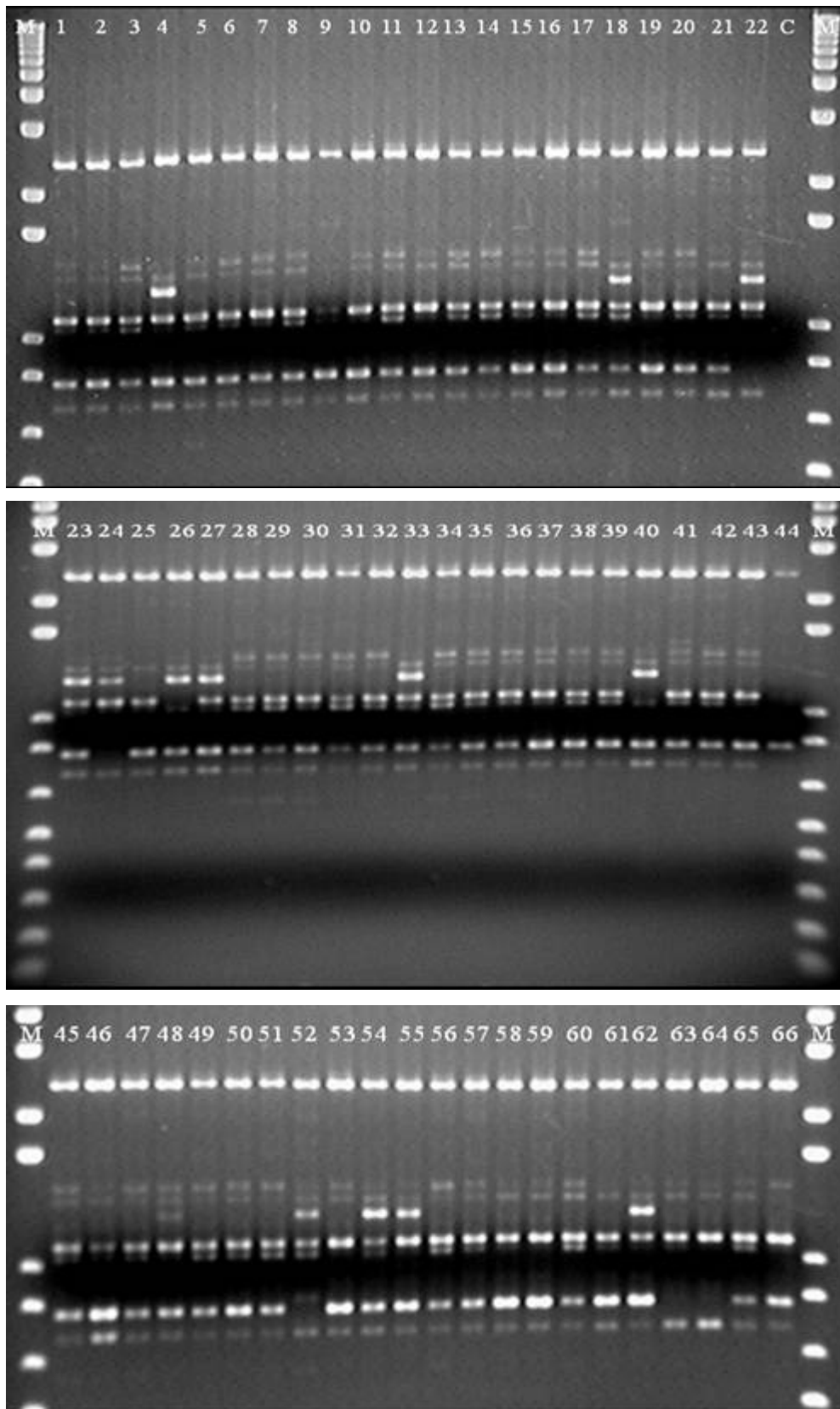


Figura 6. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPD-10. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.

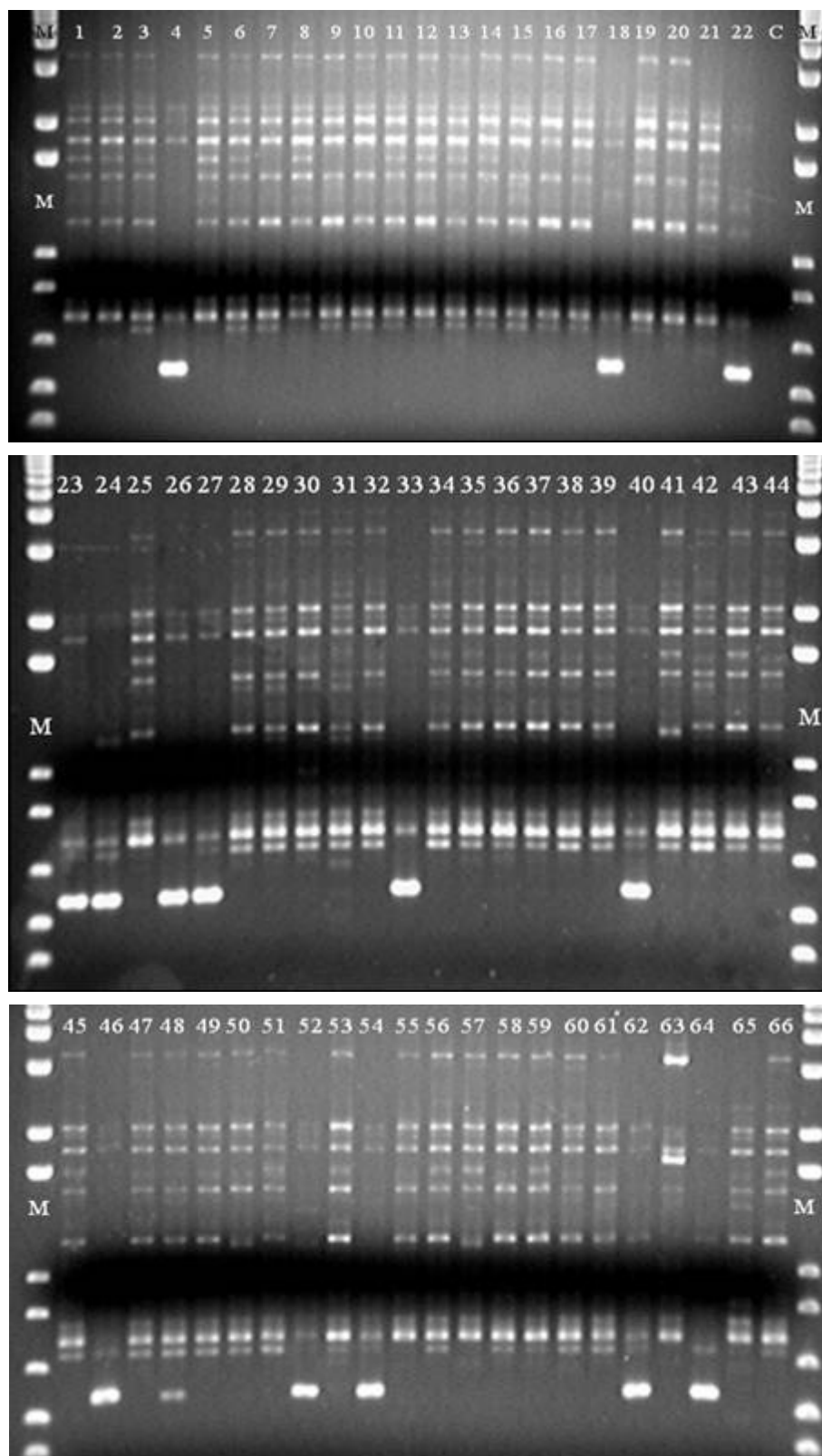


Figura 7. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPE-17. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.

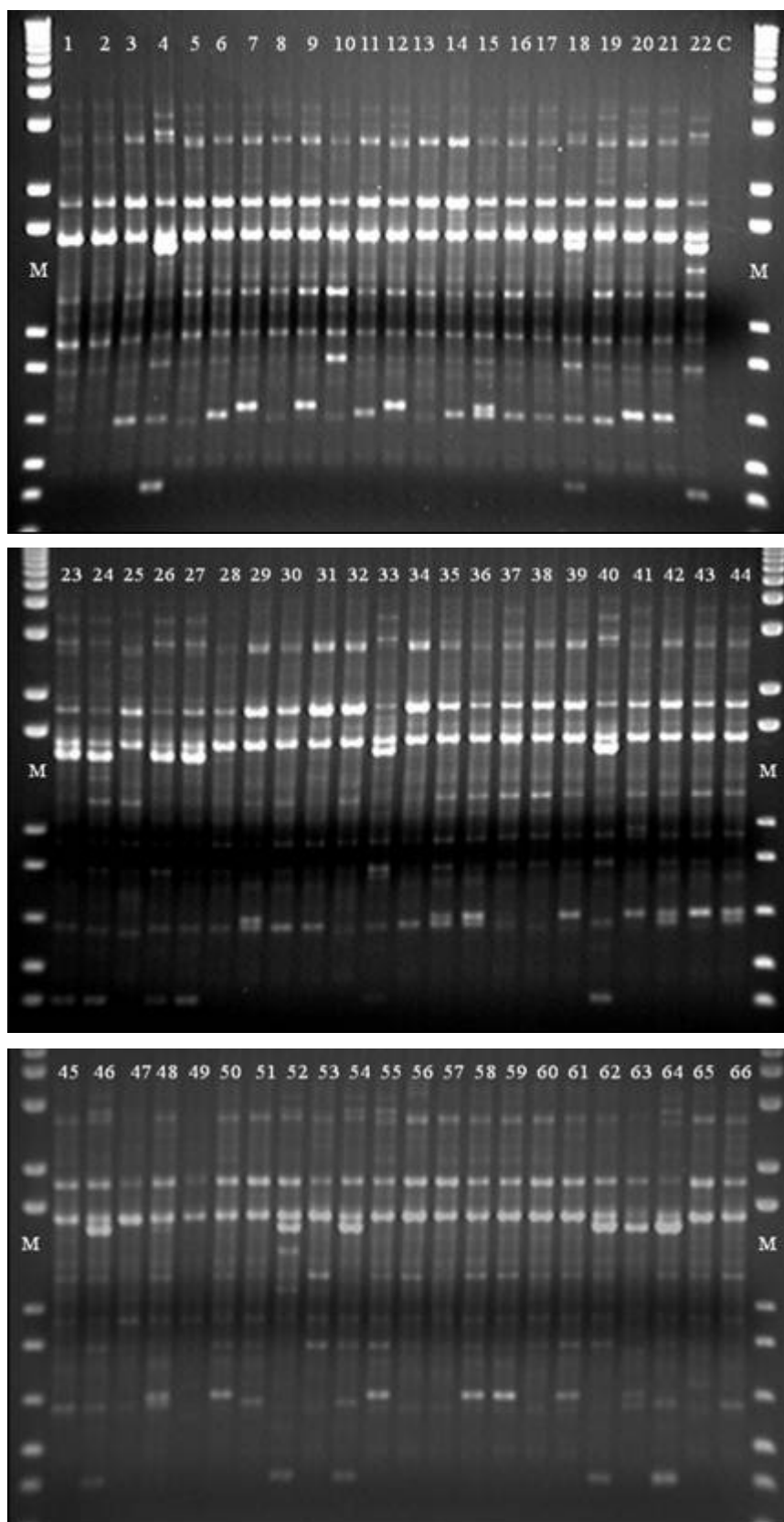


Figura 8. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPH-05. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.

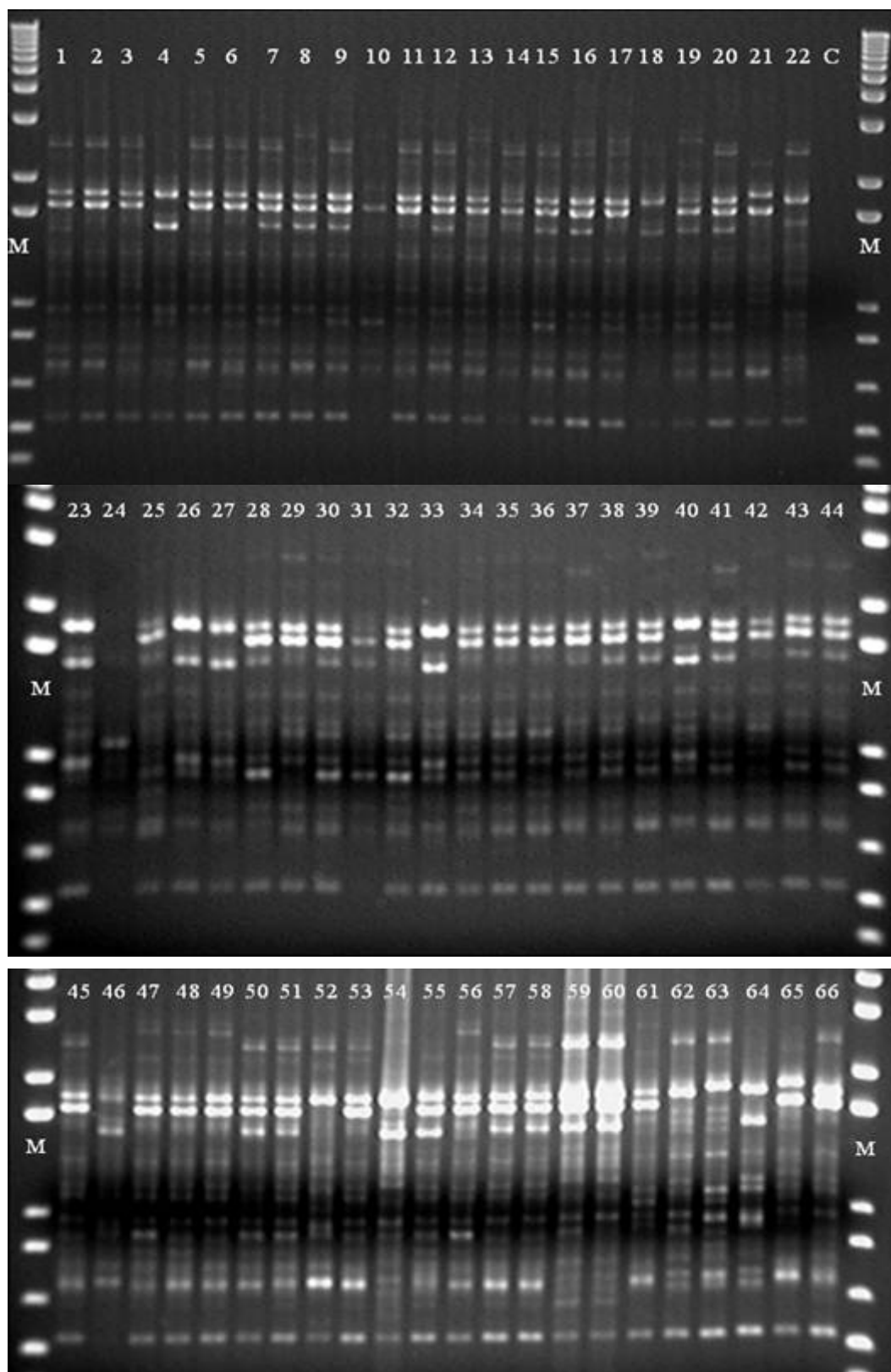


Figura 9. Perfil de bandas geradas pela amplificação do DNA de variedades de arroz com o primer OPP-02. M – Marcador 1kb plus DNA Ladder; C – Controle negativo; 1 a 66 – Variedades de arroz conforme identificadas por NCL na tabela 4.

4.3. Dendrograma de Similaridade Genética

O dendrograma de similaridade genética, obtido a partir da análise RAPD apresentou dois grandes grupos: Grupo I e Grupo II (Figura 10). O grupo I se mostrou bastante heterogêneo quanto à origem das variedades analisadas incluindo melhoradas brasileiras, importadas, acessos de banco germoplasma e algumas poucas provenientes de cultivos por agricultores do Estado do Maranhão. A variedade Piauí agrupou com 88% de similaridade com a variedade IAC-600. A variedade IAC-600 é o famoso *arroz preto*, desenvolvido pelo Instituto Agronômico de Campinas (SP).

Embora heterogêneo na sua magnitude, o grupo I apresentou sucessivas subdivisões que separaram bastante as variedades nele agrupadas. Dentro do agrupamento I.1a houve variedades que apresentaram 100% de similaridade: Dourado Precoce e IAC-4440; Dobradinho e Zebu Branco. A variedade melhorada IAC-47 agrupou com 95% de similaridade com Dourado Precoce e IAC-4440.

Todas as variedades melhoradas agruparam no Grupo I, destacando que oito delas agruparam na subdivisão I.1a (IAC-600, IAC4440, IAC47, IAC202, Dongjin, IR-08, SBT-33 e IAC-1278) A variedade IAC-25 ficou na subdivisão I.1b, enquanto que a Nipponbare uma variedade do Japão ficou no subgrupo 1.2.

Outro fato interessante foi que a maior parte das variedades de nome Lajeado provenientes de banco germoplasma se incluíram no grupo I, sendo que quatro delas fizeram uma subdivisão à parte dentro do subgrupo I.1b e se agruparam em pequeno subgrupo à parte (Figura10). Deve ser destacado que a Lageado Liso-220029 e a Lageado 220006 agruparam com mais de 80% de similaridade, como também observado por Areias et al. (2006).

O grupo II por sua vez (Figura 10) apresentou como característica particular o fato de ter agrupado exclusivamente variedades provenientes das lavouras das cidades de Arari, Miranda do Norte, Penalva, Vitória do Mearim e Viana no estado do Maranhão, o que sugere uma estreita base genética das variedades lá cultivadas. Dentre elas, Zebu Branco, Canela de Ferro e Rabo de Burro apresentaram 100% de similaridade genética, como também o agrupamento Arroz 70, Cutiã e Pingo d'água. Essas seis variedades apresentaram entre si 95% de similaridade.

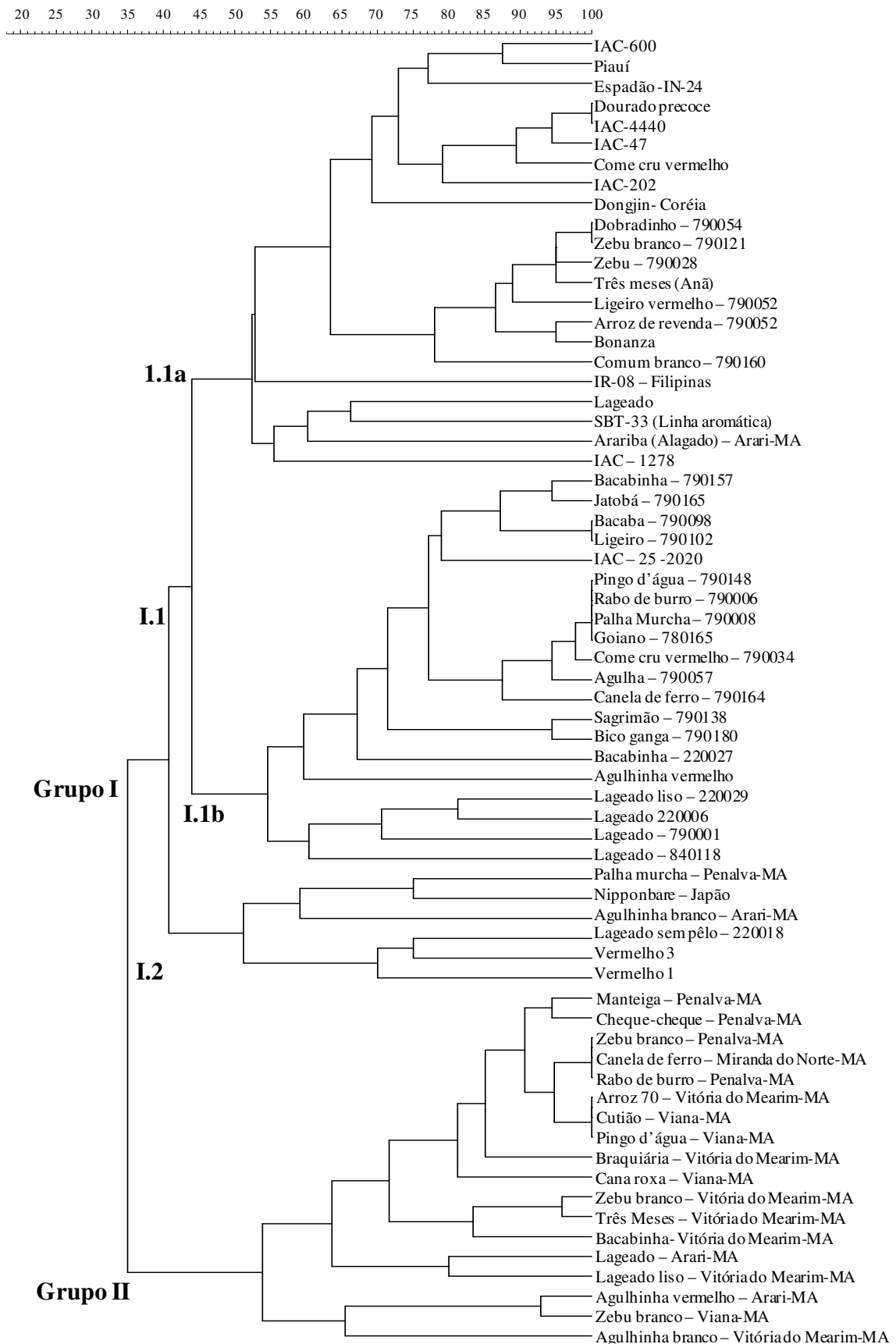


Figura 10. Dendrograma de similaridade genética a partir dos produtos amplificados do DNA de 66 variedades de arroz por RAPD com base no coeficiente de similaridade de Jaccard.

4.4 Tamanho dos Grãos e Proteína Bruta

Nas tabelas 6 a 10 podem ser observados o tamanho dos grãos, as relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura e a percentagem de proteína nos grãos com casca de acordo com os agrupamentos do dendrograma de similaridade genética por RAPD (Figura 10).

Os grãos mais finos e longos, ou seja, com maior relação comprimento largura, estão no Grupo I, com destaque para a variedade Espadão (Tabela 6) que apresenta excepcional comprimento de 15,60 mm e relação C/L de 6,61 e, enquanto que em média no Grupo I as maiores relações C/L estão entre 3 e 4 e comprimento entre 9 e 12 mm (Tabelas 6 a 10).

Tabela 6. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura (E/L) e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do subgrupo I.1a do dendrograma de similaridade genética por RAPD.

VARIETADES Subgrupo I.1a*	Compri- mento (mm)	Largura (mm)	Espessu- ra (mm)	Relação C/L	Relação E/L	Proteína bruta (%)
IAC-600	7,82	2,74	2,00	2,86	0,73	7,33
PIAÚÍ	7,79	3,21	2,24	2,43	0,70	5,94
ESPADÃO	15,60	2,44	2,06	6,41	0,84	7,23
DOURADO PRECOCE	9,89	2,96	2,16	3,34	0,73	7,49
IAC-4440	8,98	2,44	1,93	3,69	0,79	5,70
IAC-47	9,63	3,05	2,21	3,15	0,72	8,23
COME CRU VERMELHO	8,55	3,21	2,14	2,67	0,67	8,62
IAC-202	9,24	2,38	1,98	3,88	0,83	6,31
DONGJIN	6,77	2,92	2,31	2,32	0,79	7,87
DOBRADINHO	7,34	3,11	2,25	2,36	0,72	6,15
ZEBU BRANCO-21	7,51	3,06	2,38	2,46	0,78	10,60
ZEBÚ	7,42	3,30	2,36	2,25	0,72	10,77
TRÊS MESES	7,26	3,12	2,17	2,33	0,70	7,71
LIGEIRO VERMELHO	8,07	3,24	2,25	2,50	0,69	7,57
ARROZ REVENDA	9,35	2,85	2,24	3,28	0,79	7,22
BONANZA	9,44	2,51	1,99	3,77	0,79	7,12
COMUM BRANCO	7,68	3,06	2,19	2,51	0,72	8,39
IR-08	7,69	2,51	1,94	3,08	0,77	11,60
LAGEADO	9,08	2,42	1,83	3,75	0,76	5,26
SBT-33	10,79	3,35	1,86	4,23	0,56	5,13
ARARIBA	9,09	2,19	1,84	4,15	0,84	5,69
IAC-1278	9,41	2,64	1,98	3,57	0,75	6,14
Média do subgrupo*	8,84	2,85	2,11	3,23	0,74	7,46

* Valores médios a partir 18 grãos selecionados aleatoriamente para cada variedade

*Média dos valores médios obtidos para as variedades constituintes do subgrupo

Tabela 7. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura (E/L) e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do subgrupo I.1b do dendrograma de similaridade genética por RAPD.

VARIETADES Subgrupo I.1b*	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Relação C/L	Relação E/L	Proteína bruta (%)
BACABINHA-57	6,79	2,76	1,56	2,46	0,57	7,59
JATOBÁ	7,82	3,27	2,23	2,39	0,68	8,76
BACABA	12,71	3,03	2,30	4,19	0,76	7,70
LIGEIRO	8,18	3,40	2,27	2,41	0,67	8,58
IAC-25	9,40	2,61	2,17	3,61	0,83	7,48
PINGO D'AGUA-48	7,80	3,17	2,19	2,47	0,69	10,65
RABO DE BURRO	6,75	3,17	2,20	2,13	0,69	8,01
PALHA MURCHA	8,19	3,15	2,20	2,61	0,70	6,37
GOIANO	8,62	2,78	2,18	3,12	0,78	6,32
AGULHA 76	8,36	3,22	2,24	2,60	0,70	5,61
CANELA DE FERRO-64	7,98	3,39	2,17	2,36	0,64	9,95
SAGRIMÃO	12,71	3,09	2,30	4,13	0,74	6,82
BICO GANGA	9,30	3,25	2,19	2,86	0,67	7,31
BACABINHA-27	6,48	3,27	2,29	1,99	0,70	4,79
AGULHINHA VERMELHO	8,89	2,24	1,68	3,97	0,75	4,34
LAGEADO LISO	9,36	2,58	1,98	3,63	0,77	6,36
LAGEADO-06	9,10	2,79	2,13	3,26	0,76	5,14
LAGEADO-01	8,98	2,48	1,96	3,62	0,79	6,11
LAGEADO-18	8,55	2,46	1,86	3,48	0,76	4,78
Média do subgrupo*	8,90	2,95	2,14	3,08	0,73	6,84

* Valores médios a partir 18 grãos selecionados aleatoriamente para cada variedade

*Média dos valores médios obtidos para as variedades constituintes do subgrupo

Tabela 8. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura (E/L) e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do subgrupo I.2 do dendrograma de similaridade genética por RAPD.

VARIETADES Subgrupo I.2*	Comprimento (mm*)	Largura (mm*)	Espessura (mm*)	Relação C/L*	Relação E/L*	Proteína bruta (%)
PALHA MURCHA-PE	9,14	3,48	2,19	2,63	0,63	4,67
NIPPONBARE	7,44	3,15	2,24	2,36	0,71	7,38
AGULHINHA BRANCO-AR	8,35	2,18	1,87	3,84	0,86	11,57
LAGEADO SEM PÊLO	9,06	2,51	2,01	3,61	0,80	5,21
VERMELHO-3	9,24	2,67	1,99	3,46	0,75	5,24
VERMELHO-1	9,17	3,07	2,15	2,99	0,70	4,40
Média do subgrupo*	8,73	2,84	2,08	3,15	0,73	6,41

* Valores médios a partir 18 grãos selecionados aleatoriamente para cada variedade

*Média dos valores médios obtidos para as variedades constituintes do subgrupo

Tabela 9. Tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura (E/L) e percentagem de proteína dos grãos com casca das variedades de arroz do Grupo II do dendrograma de similaridade genética por RAPD.

VARIETADES Grupo II *	Comprimento (mm*)	Largura (mm*)	Espessura (mm*)	Relação C/L*	Relação E/L*	Proteína bruta (%)
MANTEIGA	6,52	3,23	2,13	2,02	0,66	5,52
CHEQUE-CHEQUE	7,18	3,29	2,23	2,19	0,68	9,28
ZEBU BRANCO-PE	8,00	3,49	2,18	2,30	0,62	8,58
CANELA FERRO-MN	7,59	3,06	2,16	2,49	0,71	7,48
RABO BURRO-PE	8,7	3,06	2,11	2,84	0,69	4,85
ARROZ 70	9,54	3,06	2,22	3,13	0,73	6,10
CUTIÃO	8,86	3,28	2,16	2,71	0,66	4,82
PINGO D'ÁGUA-VI	7,17	3,33	2,23	2,15	0,67	5,40
BRAQUIÁRIA	9,41	2,57	1,95	3,69	0,76	5,31
CANA ROXA	7,14	3,07	2,10	2,32	0,68	7,50
ZEBU BRANCO	7,92	3,38	2,13	2,35	0,63	4,99
TRÊS MESES	8,26	3,63	2,26	2,28	0,62	7,49
BACABINHA	6,72	3,41	2,27	1,97	0,67	8,05
LAGEADO-ARARI	9,19	2,4	1,98	3,83	0,83	5,38
LAGEADO LISO	9,13	2,65	1,89	3,46	0,71	3,39
AGULHINHA VERMELHO-AR	9,92	2,46	2,01	4,03	0,82	6,06
ZEBU BRANCO-VI	7,77	3,29	2,24	2,36	0,68	4,56
AGULHINHA BRANCO-VM	8,94	2,32	1,83	3,86	0,79	4,17
Média do subgrupo*	8,22	3,05	2,12	2,78	0,70	6,05

* valores médios a partir 18 grãos selecionados aleatoriamente para cada variedade

*Média dos valores médios obtidos para as variedades constituintes do subgrupo

Tabela 10. Valores médios de tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e espessura/largura (E/L) e percentagem de proteína dos grãos com casca dos agrupamentos das variedades de arroz do dendrograma de similaridade genética por RAPD.

AGRUPAMENTOS DAS VARIEDADES	Comprimento (mm)	Largura (mm)	Espessura (mm)	Relação C/L	Relação E/L	Proteína bruta (%)
Grupo I						
Subgrupo I.1a	8,84	2,85	2,11	3,23	0,74	7,46
Subgrupo I.1b	8,90	2,95	2,14	3,08	0,73	6,84
Subgrupo I.2	8,73	2,84	2,08	3,15	0,73	6,41
Médias Grupo 1	8,82	2,88	2,11	3,15	0,73	6,90
Grupo II	8,22	3,05	2,12	2,78	0,70	6,05

Em média os grãos mais largos ($L > 3$ mm) estão no Grupo II, com destaque para a variedade Três meses de Vitória do Mearim que apresentou largura média 3,63 mm (Tabelas 9 e 10). Entretanto, mais da metade das variedades da subdivisão I.1b apresenta grãos com largura média superior a 3 mm (Tabela 7) e média de 2,95 mm (Tabela 10). No Grupo II estão também os grãos mais redondos, ou seja, com as menores relações C/L (Tabelas 9 e 10).

Houve Grande variação nos teores de proteína bruta dos grãos entre as variedades estudadas (Tabelas 6, 7, 8, 9 e 10). Areias et al. (2006) encontrou 7,20% de proteína bruta para a variedade Lageado-220006 e 13,38% para a Jatobá-79016, enquanto nesse trabalho observou-se, respectivamente, para as mesmas variedades os teores de proteína bruta de 5,15 % e 8,76 % (Tabela 7).

Segundo Juliano (1980), os teores de proteína bruta dos grãos de arroz podem variar cerca de sete pontos percentuais, devido a mudanças nas condições ambientais. Como os grãos utilizados nesse experimento são de diferentes origens, e condições de produção justificam as variações encontradas. Ferraz Jr et al. (2001) observaram em cinquenta variedades de arroz provenientes do Maranhão uma variação de 99,8% no teor de proteína bruta, com os teores entre 6,36% a 12,71%.

Pode ser observado na Figura 11 que ao se fazer a avaliação do tamanho dos grãos (comprimento, largura e espessura em mm), relações comprimento/largura (C/L) e percentagem de proteína dos grãos das variedades de arroz com casca, por meio da análise de componentes principais, os agrupamentos por semelhança, no gráfico de scores se dividiram em três principais (Grupos 1, 2 e 3). Deve ser destacado que o Grupo 3 (Figura 11 e Tabela 11) é composto por grande parte das variedades do Grupo II do dendrograma de similaridade genética (Figura 10), que apresentam os grãos mais redondos (Tabela 9 e 10).

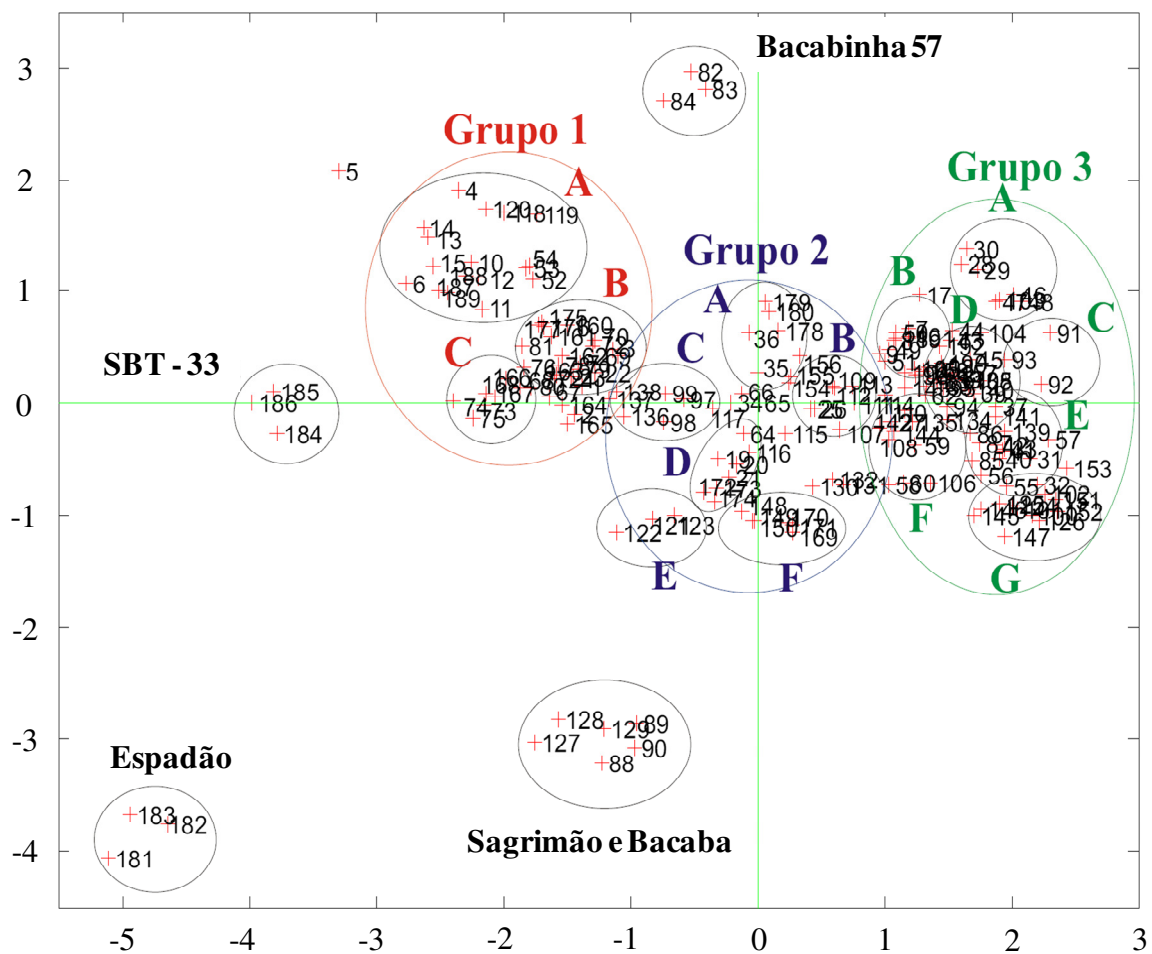


Figura 11. Gráfico de Scores obtido através da análise de componentes principais (PCA, 5%): Mostra os agrupamentos das variedades por semelhança quanto aos parâmetros comprimento, largura, espessura (mm) e relação comprimento/largura. Três números consecutivos dentro dos grupos correspondem à indentificação de três repetições para cada variedade e não a valores para os parâmetros avaliados.

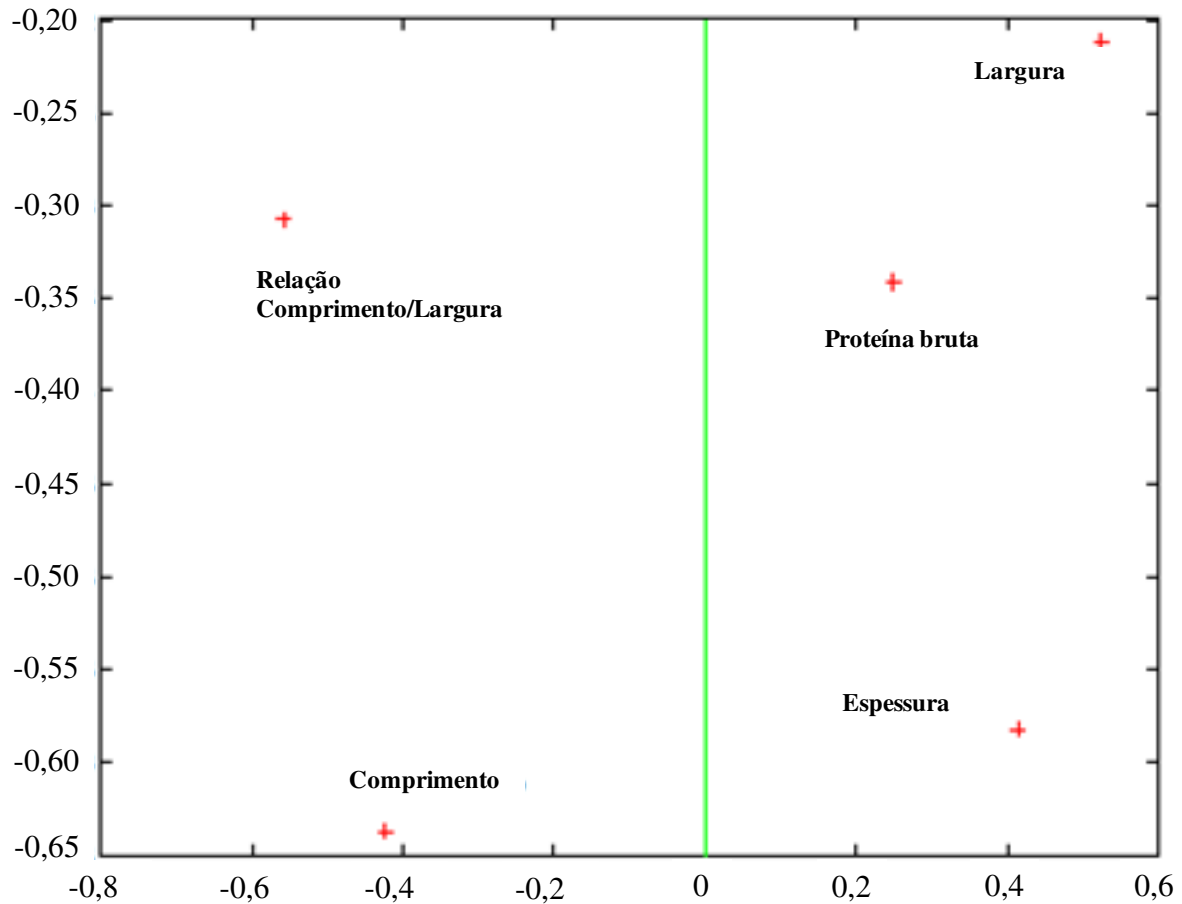


Figura 12. Gráfico de Loadings obtido através da análise de componentes principais (PCA, 5%): Mostra a participação dos parâmetros comprimento, largura, espessura (mm) e relação comprimento/largura na formação dos agrupamentos no gráfico de Scores. Quanto mais próximo do ponto assinalado (+), maior é o valor para o parâmetro indicado.

Tabela 11. Variedades de arroz dos grupos 1, 2 e 3 obtidos através da análise dos componentes principais (ver figura 11, gráficos de scores).

Grupo	Subgrupo	Variedade de Arroz		
1	A	AGULHINA VERMELHO AR AGULHINHA BR VM LAGEADO 18 LAGEADO ARARI LAGEADO LISO ARARIBA		
		B	IAC 4440 LAGEADO LAGEADO 01 LAGEADO SEM PELO LAGEADO LISO 29 VERMELHO 3 BRAQUIÁRIA AGULHINA BONANZA	
			C	IAC 202 AGULHINHA VERMELHO
	A			IAC 600 RABO DE BURRO
			2	B
	C			
D		GOIANO ARROZ 70 DOURADO PRECOSE		
	E	IAC 25		
F	ARROZ DE REVENDA IAC 47 BICO GANGA			
3	A	MANTEIGA BACABINHA		
		B	CANOA ROXA ZEBU BRANCO ZEBU BRANCO VI PINGO D'ÁGUA	
	C		BACABINHA	
			D	PIAÚÍ CANELA DE FERRO-64 DONGJIN 3 MESES ANÃ NIPPONBARE RABO DE BURRO CHEQUE - CHEQUE
	E	DOBRADINHO CANELA DE FERRO MN ZEBU BRANCO PE TRÊS MESES JATOBÁ		
		F		COMUM BRANCO LIGEIRO VERMELHO PALHA MURCHA PE COME CRU VERMELHO
				G

4.5 Cinética de Absorção de Nitrato

Analisando a Figura 11 pode-se observar que houve uma queda intensa nas primeiras duas horas do período experimental, independente das variedades. Esse fato pode ser atribuído a previa retirada de N da solução nutritiva por um período de 72 horas. Segundo GAZZARRINI et al. (1999), a absorção de N aumenta quando plantas são submetidas a um período de deficiência do nutriente, sendo a magnitude desse incremento função da concentração de N na solução.

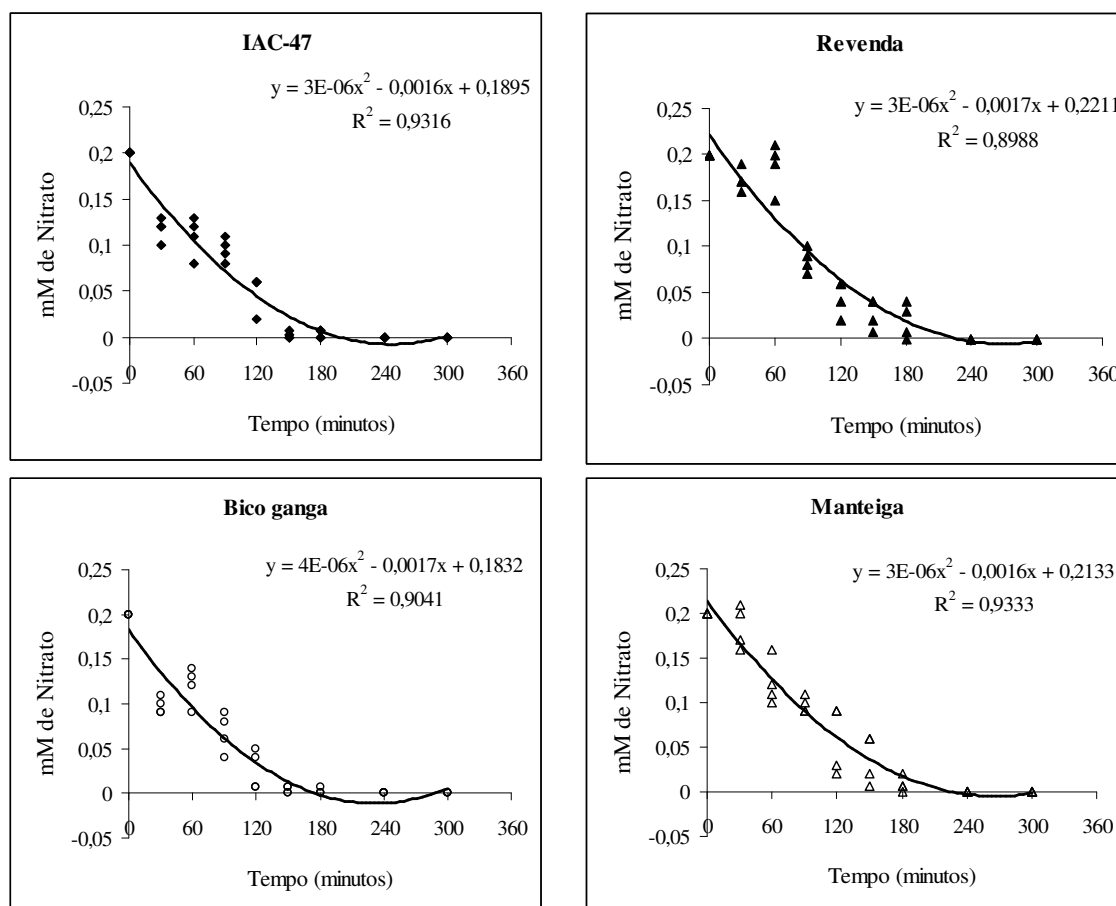


Figura 13. Depleção de $N-NO_3^-$ na solução nutritiva em decorrência da absorção por quatro variedades de arroz (IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga) submetidas a $0,2 \text{ mmol. L}^{-1}$ de $N-NO_3^-$, após passar por 72 horas em solução sem nitrogênio.

Na Figura 14 pode-se observar que os maiores valores de $V_{\text{máx}}$ foram apresentados pelas variedades Bico ganga, Revenda e Manteiga, enquanto as variedades IAC-47 e Revenda apresentaram os menores valores de K_m . Os valores de K_m para as variedades IAC-47 e Bico ganga foram ainda semelhantes aos encontrados por Baptista (2002), indicando consistência do procedimento de obtenção destes resultados.

O estudo da cinética da absorção de N reflete o papel fisiológico da classificação dos sistemas de transporte baseada na afinidade do transportador pelo substrato. Basicamente isso significa a garantia de manter disponível a quantidade mínima necessária de N para o desenvolvimento vegetal. A alta afinidade do sistema de transporte é uma característica importante, mas que só assume relevância fisiológica em condições ambientais em que há soluções diluídas do nutriente (Epstein e Bloom, 2005).

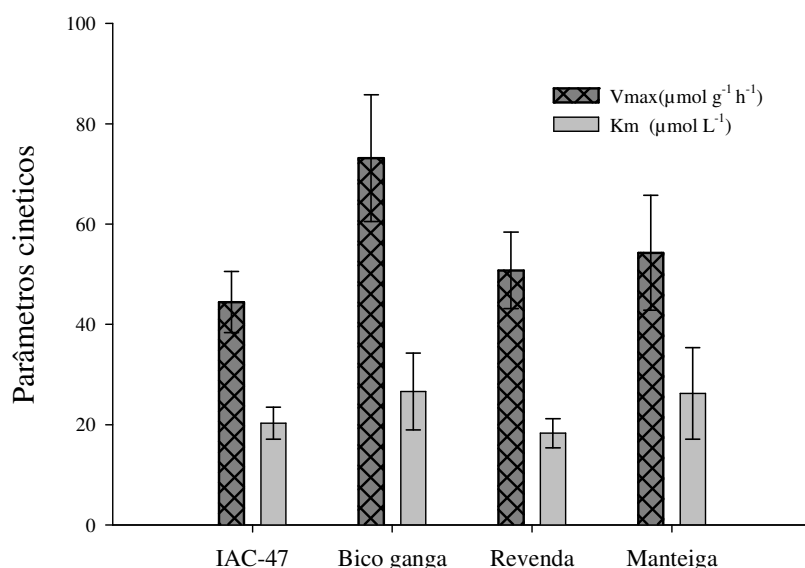


Figura 14. Parâmetros cinéticos $V_{máx}$ e K_m de quatro variedades de arroz (IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga) submetidas a $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de N-NO_3^- , após passar por 72 horas em solução sem nitrogênio.

Analisando as variações dos parâmetros cinéticos em relação ao aumento na concentração de N no meio, quando do suprimento com $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- na solução nutritiva se observa que a $V_{máx}$ foi maior para a variedade Bico Ganga (Figura 14).

Praticamente entre três e quatro horas após o fornecimento de $0,2 \text{ mM}$ de N-NO_3^- (Figura 13) houve o completo esgotamento do N da solução nutritiva, nas quatro variedades.

Não houve diferenças quanto à massa fresca da parte aérea das variedades Bico ganga, Revenda e Manteiga. A variedade IAC-47 apresentou maior massa fresca de parte aérea e raiz, enquanto que a variedade Bico Ganga apresentou a menor massa de raiz (Tabela 12).

Tabela 12. Massa fresca (g/pote) da raiz e parte aérea e relação Raiz/parte aérea de quatro variedades de arroz (IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga) submetidas a $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de N-NO_3^- , após passar por 72 horas em solução sem nitrogênio.

Massa Fresca (g/pote)	Variedades de arroz			
	IAC-47	Bico ganga	Revenda	Manteiga
Parte Aérea	13,13	11,02	11,60	10,73
Raiz	9,13	7,42	8,31	8,89
Relação Raiz/P. Aérea	0,69	0,57	0,71	0,83

A relação raiz: parte aérea reflete a capacidade da planta em desenvolver o sistema radicular em relação à parte aérea. A variedade IAC-47 apresentou o segundo menor valor (Tabela 12), esse resultado reflete a seleção que a variedade sofreu durante o melhoramento vegetal, visando maior produção em altos níveis de nutriente. A maior relação raiz:parte aérea foi observada para a Manteiga (variedade local do Maranhão), indicando produção de fitomassa destinada ao desenvolvimento do sistema radicular para melhor explorar ambientes com pouca disponibilidade de nutrientes.

4.6 Cinética de Expressão dos Transportadores de Nitrato

Na Figura 15 são apresentados os níveis de expressão relativa dos genes dos transportadores de nitrato OsNRT2.1, OsNRT2.2 e OsNRT1.1 em raízes das variedades de arroz IAC-47, Bico Ganga, Revenda e Manteiga nos tempos três, seis e nove horas após o fornecimento de 0,2 mM de N-NO₃⁻. Os níveis de expressão apresentados foram calculados em relação a um gene controle (*OsAct*) para o qual admite-se que a expressão não varia em função do tratamento, e em relação a plantas mantidas sem o ressuprimento de nitrogênio; portanto, correspondem a níveis de indução pelo nitrato.

Às três horas após o fornecimento de 0,2 mM de nitrato podem ser observados aumentos de aproximadamente 40 a 250 vezes na expressão dos genes dos transportadores OsNRT2.1 e OsNRT2.2. Conforme observado no trabalho de ARAKI e HASEGAWA (2006) na cultivar de arroz Nipponbare, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são genes passíveis de indução pelo nitrato e que apresentam picos de expressão em torno de três horas após o seu ressuprimento. Da mesma forma, neste trabalho, todas as variedades também apresentaram maiores níveis de expressão de *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* no tempo de três horas em relação aos demais tempos avaliados. No entanto, em *Arabidopsis thaliana*, HU et al. (2009) observaram através de análise time course que o pico de indução para *AtNRT2.1* e *AtNRT1.1* é atingido em apenas 30 minutos do ressuprimento, indicando que o tempo de resposta desses genes podem variar grandemente de uma espécie para outra. Esse pico de expressão dos transportadores OsNRT2.1 e OsNRT2.2 no tempo de três horas coincide com o pico de expressão das P-H⁺ATPases em milho (Santi et al.,1995), responsáveis pelo bombeamento de prótons para o exterior da célula para permitir a absorção de nitrato pelos transportadores em simporte com 2H⁺. Segundo WIRTH et al. (2007) o transportador OsNRT2.1 é responsável pela absorção de até 75% de todo o nitrato disponível em *Arabidopsis thaliana*.

A variedade Revenda apresentou maior expressão dos genes dos transportadores OsNRT2.1 e 2.2 em todos os tempos avaliados, mantendo os níveis de expressão mais altos do que as outras variedade, mesmo no tempo 9 horas (Figura 15 A e B).

Ao se avaliar a expressão do gene *OsNRT1.1* que codifica um transportador de nitrato já presente mesmo antes do ressuprimento conforme relatado por Araki e Hasegawa (2006), e que atua nas faixas de alta e baixa afinidade (Wang et al.,1998; LIU et al., 1999), pôde-se observar sua baixa indução (até 3 vezes) (Figura 15 C) com provável baixa participação na absorção do nitrato quando comparado aos transportadores de alta afinidade (OsNRT2.1 e 2.2) (Figura 15 A e B).

Considerando-se todos os tempos avaliados, observa-se que *OsNRT2.1* e *2.2* exibem um semelhante padrão de rápida indução, seguida de repressão em todas as variedades; enquanto *OsNRT1.1* exibiu um padrão e resposta irregular, com picos de resposta de indução mais tardios para as variedades IAC-47 (6 horas) e Revenda (9 horas) (Figura 15 C).

Outro fato interessante, é que embora os níveis de indução do *OsNRT1.1* tenham sido de um modo geral, significativamente menores; as variedades com maiores respostas de *OsNRT1.1* foram as mesmas que apresentaram as maiores respostas para os demais genes estudados; de tal forma, que a manutenção dos níveis de expressão de *OsNRT2.1-2.2* para a variedade Revenda durante a fase de repressão parece estar relacionada com maiores níveis de expressão do *OsNRT1.1*.

Resultados obtidos em *Arabidopsis* por Ho et al. (2009) demonstram o papel do NRT1.1, também chamado CHL1, como constituinte do mecanismo de sinalização para reconhecimento da presença do nitrato na solução, enquanto que segundo GIRIN et al. (2007), a expressão de *NRT2.1* foi fortemente reprimida por produtos da assimilação de nitrato. Dessa forma, o efeito de indução pelo nitrato, livre da repressão por feedback, explica a explosão de resposta dos *OsNRT2*'s (indução de até 250 vezes) nas primeiras horas. Pode-se ainda supor

que a relação entre níveis de indução de *OsNRT1.1* e a manutenção da indução dos *OsNRT2s* nos tempos seis e nove horas nas variedades IAC-47 e Revenda poderia ser em decorrência de uma razão entre os efeitos de maior indução de *OsNRT1.1* e os efeitos de repressão por feedback, onde maiores níveis de NRT1.1 nessas variedades permitiria à elas detectar menores níveis de nitrato na solução.

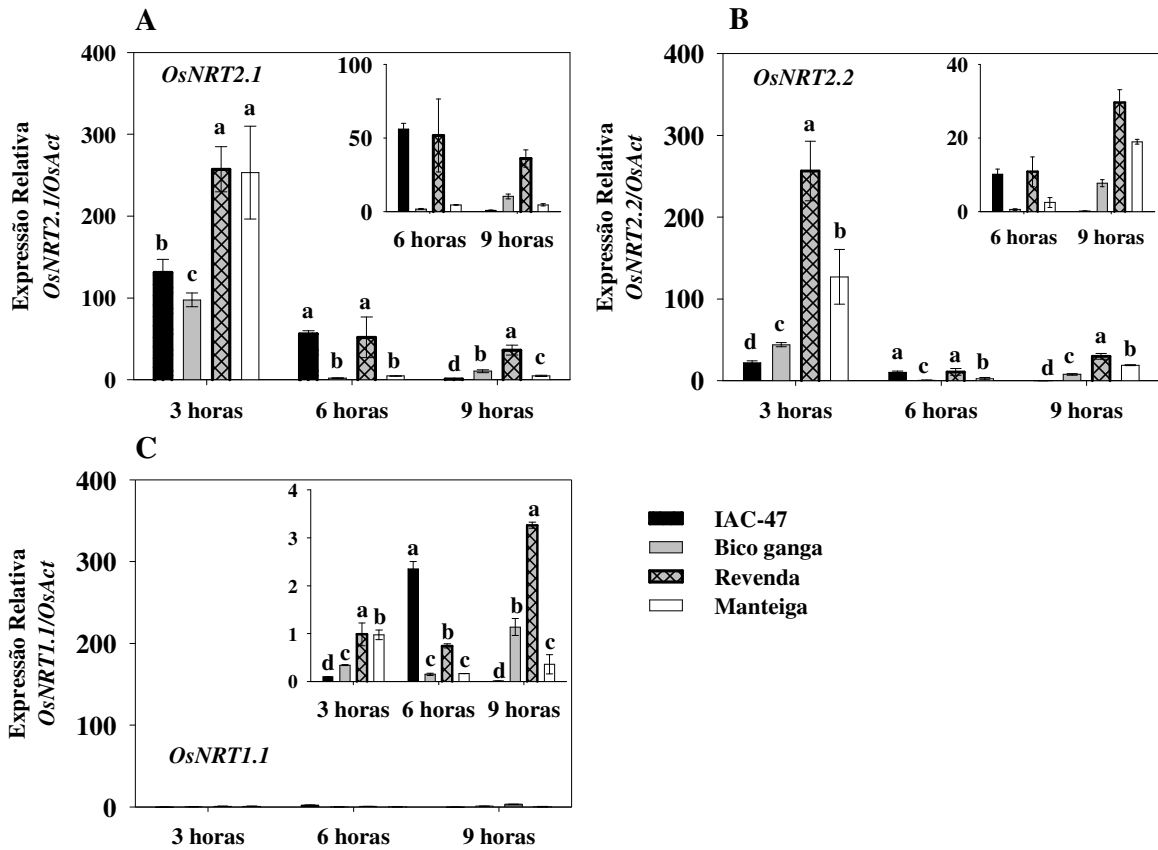


Figura 15. Níveis de expressão relativa dos transportadores de nitrato *OsNRT2.1*, *OsNRT2.2* e *OsNRT1.1* nas raízes de quatro variedades de arroz e em três tempos após o fornecimento de 0,2 mM de $N-NO_3^-$. Os níveis de expressão são relativos ao um gene controle *OsAct* e a plantas mantidas sem N. Nos inserts podem ser vistos detalhes dos gráficos em escala ampliada.

Ao se comparar a cinética de absorção de nitrato com a expressão dos transportadores foi observado que a variedade IAC-47 apresentou menor $V_{m\acute{a}x}$ em relação às outras variedades, e que não houve grande aumento da expressão do *NRT2.1* na IAC-47, quando comparada com a Revenda e Manteiga, três horas após o fornecimento de nitrato. Neste mesmo tempo a IAC-47 apresentou a menor indução do *NRT2.2* e às nove horas não houve expressão detectável (Figuras 13 e 14). A variedade Bico Ganga, apesar do maior $V_{m\acute{a}x}$ teve menor expressão dos transportadores de nitrato, indicando que outros fatores podem estar contribuindo para a absorção, como o gradiente de prótons gerado pelas $H^+ATPases$.

A variedade IAC-47 apesar de pertencer ao mesmo agrupamento de similaridade genética da variedade Revenda (Subgrupo I.1a, Figura 10), e terem ambas as variedades tamanhos de grãos e relações comprimento largura semelhantes (Tabela 6), apresentam apenas 63% de similaridade genética. Portanto a luz dos resultados apresentados, a variedade Revenda demonstra ter mecanismos que propiciam maior capacidade de absorção de nitrato quando ele se torna disponível à planta.

5 CONCLUSÕES

O dendrograma de similaridade genética, obtido a partir da análise RAPD, apresentou dois grandes grupos: Grupo I e Grupo II. O grupo I se mostrou bastante heterogêneo quanto à origem das variedades analisadas. Todas as variedades melhoradas agruparam no Grupo I. A maior parte das variedades de nome Lageado provenientes de banco de germoplasma esta no grupo I.

O grupo II agrupou exclusivamente variedades provenientes das lavouras do estado do Maranhão, o que sugere uma estreita base genética das variedades lá cultivadas. Os grãos mais finos e longos, ou seja, com maior relação comprimento largura estão no Grupo I, enquanto no Grupo II estão os grãos mais redondos, ou seja, com as menores relações C/L.

As variedades Revenda e Manteiga apresentaram maior expressão dos transportadores de alta afinidade OsNRT2.1 e 2.2, em todos os tempos, sendo que a Revenda mantém os níveis de expressão mais altos do que as outras variedade, mesmo no tempo 9 horas.

Ao se comparar a cinética de absorção de nitrato com a expressão dos transportadores pode-se observar que a variedade IAC-47 apresenta a menor $V_{máx}$ em relação às outras variedades, e que não houve grande aumento da expressão do NRT2.1 na IAC-47, quando comparado com a Revenda e Manteiga às três horas após o fornecimento de nitrato.

Apesar das variedades IAC-47 e Revenda pertencerem ao mesmo agrupamento de similaridade genética e terem tamanhos de grãos e relações comprimento largura semelhantes, apresentaram apenas 65% de similaridade genética; portanto de acordo com os resultados, a variedade Revenda demonstra ter mecanismos que propiciam maior capacidade de absorção de nitrato quando ele se torna disponível à planta.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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*, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1281-1288, 2003.
- AREIAS, R. G. B. M.; PAIVA, D. M de; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Similaridade genética de variedades crioulas de arroz em função da morfologia, marcadores RAPD e acúmulo de proteína nos grãos, *Bragantia*, Campinas, v.65, p.19 - 28, 2006.
- BAPTISTA J.A. Caracterização genética de arroz (*Oryza sativa* L.) através de marcadores moleculares RAPD e eficiência na aquisição de N. 2002. Tese (Doutorado em Agronomia Ciências do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.
- BHUYAN, N; BORAH, B. K ; SARMA, R. N. Genetic diversity analysis in traditional lowland rice (*Oryza sativa* L.) of Assam using RAPD and ISSR markers. *Current Science*, v.93, n.7, p. 967-972, 2007.
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, New York, US., v.6, p.853-855, 1975.
- CLAASSEN, N.; BARBER, S.A. A method for characterizing the relation between nutrient and concentration and flux into roots of intact plant. *Plant Physiology*, Rockville, v.54, p.564-568, 1974.
- COMETTI, N. N.; FURLANI, P. R.; RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. Soluções Nutritivas: formulação e aplicações. In: MANLIO SILVESTRE FERNANDES. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, v. 1, p. 89-114.
- CONAB. Arroz – Brasil: série histórica de produção: safras 1976/77 a 2009/10. Brasília, 2009. Disponível: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/ArrozSerieHist.xls>>. Acesso em: 11 Jan. 2009.
- DAHLBERG, J. A. ZHANG X., HART G.E.MULLET J.E. Comparative assessment of variation among sorghum germoplasm accessions using seed morphology and RAPD measurements. *Crop Science*, Texas, v. 42, n. 1, p. 291-296, 2002.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. Trad.M.E.T. Nunes. Londrina: Editora Planta, 2006, 403p.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*. 2ª Ed. Editora Sinauer, 400p. 2005.
- EPSTEIN, E.; HAGEN, C. E. A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiology*, v. 27, p.457 – 474, 1952.
- FERRAZ JR, A.S.L.; SOUZA, S.R; FERNANDES, M.S. Ciclagem de nutrientes em sistema de cultivo em aléias. *Pesquisa em Foco*, v.32, n.5, p.7-29, 1997.

- FERRAZ JUNIOR, A. S. L.; SOUZA S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES M. S. Crude protein in rice grown in different environmental conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, New Delhi, v. 7, n. 2, p. 149-157, 2001.
- FERREIRA, M. E e GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998. 220p.
- FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta*, v.207, p.461-469, 1999.
- FORDE, B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1465, p.219-235, 2000.
- GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n.306, p. 295-306, 2004.
- GAZZARRINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W.B.; VON-WIREN, N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, v.11:937-947. 1999
- GIRIM, T.; LEJAY, L.; WIRTH, J.; WIDIEZ, T.; PALENCHAR, P. M.; NAZOA, P.; TOURAINE, B.; GOJON, A.; LEPETIT, M. Identification of a 150 bp cis-activating element of the AtNRT2.1 promoter involved in the regulation of gene expression by the N and C status in the plant. *Plant, Cell and Environment*, v.30. p.1366-1380, 2007.
- GLASS, A. D. M.; BRITO, D. T.; KAISER, B. N.; KRONZUCKER, H. J.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; SILIM, S.; VIDMAR, J. J.; ZHUO, D. Nitrogen transport in plants, with an emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. *J Plant Nutr Soil Sci*, v.164, p.199–207, 2001.
- 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.597-605, 2004.
- GREENLAND, D.J. Nitrate fluctuations in tropical soils. *Journal Agricultural Science*, Tokyo, v.50, p.82-91, 1958.
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M. e 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.
- 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, 347, 1950.
- HU, H. C.; WANG, Y. Y.; TSAY, Y. F. AtCIPK8, a CBL-interacting protein kinase, regulates the low-affinity phase of the primary nitrate response. *The Plant Journal*. v.57, p.264 – 278, 2009.

- ISHII, T.; NAKAMO, T.; MAEDA, N., KAMIJIMA. Phylogenetic relationships in A-genome species of rice as revealed by RAPD analysis. *Genes Gene Syst*, aug v. 71, n.4, p. 196-201, 1996.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. *Bulletin Société Vaudoise Science Nature, França*, v. 3, n. 7, p. 547-579, 1976.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical Biophysical Research Communications*, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- JULIANO, B. O. Properties of the rice caryopsis. In: LUH, B. S. (Ed.). *Rice: Production and utilization*. Westport: Connecticut AVI Publishing. 1980. p.403-438.
- JULIANO, B. O.; BECHTEL, D. B. The rice grain and its gross composition. In: JULIANO, B.O. (ed.). *Rice Chemistry and Technology*. Am.Assoc. of Cereal Chem. Minnesota, 1985.
- JULIANO, B.O. Properties of the rice caryopsis. In: LUH, B.S. (ed). *Rice production and utilization*. Avi Publishing company INC. Westport, Connecticut, USA, 1980, p. 403- 438.
- KANT, S.; BI, Y. M.; WERETILNYK, E.; BARAK, S.; ROTHSTEIN, S. The arabidopsis halophytic relative *Thellungiella halophila* tolerates nitrogen-limiting conditions by maintaining growth, nitrogen uptake, and assimilation. *Plant Physiology*, v.147, p.1168-1180. 2008.
- LIU, K.H.; HUANG, C.Y.; TSAY, Y.F. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of Arabidopsis involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell*, v.11, p.865-874, 1999.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods*. 2001, 25, 402.
- MENDONÇA, M. L S. Estudos dos mecanismos de tolerância ao alumínio e sua variabilidade genotípica em arroz (*Oryza sativa* L.) 1991. 176p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo). Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Itaguaí, 1991.
- MENGEL K.; HUTSCH B.; KANE Y. Nitrogen fertilizer application rates on cereal crops according to available mineral and organic soil nitrogen. *European Journal of Agronomy*, v.24, n.4, p.343–348, 2006
- MILLER, A. J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S. J.; WELLS, D. M. Nitrate transport and signalling. *Journal of Experimental Botany*, V. 58, N.9, p. 2297–2306, 2007.
- 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.
- NGUYEN, N. V.; FRESCO, L. O.; SOLH, M.; CALPE, C. Proceedings of the FAO Rice: Rice is life Conference, International rice commission newsletter, v.53, p.1-16, 2004. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5682e/y5682e00.pdf >. Acesso em: 22 Abril 2008.
- 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.
- QIAN, W.; GE, S.; HONG, D. Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from china detected by RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, vol. 102, p.440-49, 2001.

- RABBANI, M. A.; PERVAIZ, Z. H.; MASOOD, M. S. Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.11, n.3, p.1-10, 2008.
- RAUN W. R.; JOHNSON G. V. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agron., J.*, v.91, p.357-363, 1999
- 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, n.4, p.779–791, 2008.
- RODRIGUES, F. de S.; SOUZA, S. R. FERNANDES, M. S. Nitrogen metabolism in rice cultivated under seasonal flush of nitrate. *Journal of Plant Nutrition*, v.27, n.3, p.395-409, 2004.
- RUIZ, H.A. Estimativas dos parâmetros cinéticos em K_m e $V_{m\acute{a}x}$ por uma aproximação gráfico-matemática. *Revista Ceres*, Viçosa, v.32, n.179, p.79-84, jan./fev. 1985.
- RUIZ, H.A.; FERNANDES FILHO, E. I. Cinética: software para estimar as constantes $V_{m\acute{a}x}$ e K_m da equação de Michaelis-Menten. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, 20.; 1992. Piracicaba. Anais de simpósios. Campinas: Fundação Cargill, 1992. p.124-125. (Série Técnico-Científica, 1980).
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3ª Ed. CSHL PRESS, New York, 2001. 999p.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma membrane H^+ -ATPase in maize roots induced for NO_3^- uptake. *Plant Physiology*, v.109, p.1277-1283, 1995.
- SANTOS A. M. dos; 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. Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição *ZmDof1* e *OsDof25* sobre a eficiência de uso de Nitrogênio em *Arabidopsis thaliana* L. 2009. 81p. Tese (Doutorado em Agronomia Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.
- SANTOS, L.A. Absorção e remobilização de NO_3^- em arroz (*Oryza sativa* L.): atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo. 2006. 74p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. (Ed.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 01 ed. Viçosa, MG: SBCS, 2006, v. 01, p. 215 -252.
- 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*, New York, US, v.21, n.10, p.2049-2063, 1998.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S E MAGALHÃES, J. R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crud protein of rice. *Communication Soil Science and Plant Analyses*, v.30, n.5 e 6, p.711-724, 1999.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L.M; FERNANDES, M. L. Effects of supplemental-N on the quality of rice proteins. *Journal of Plant Nutrition*, New York, v. 9, p.40-49, 1993.

- SOUZA, S. R.; STARK, E. M.L.; MAGALHÃES, J. R. e FERNANDES, M. S. Supplemental nitrogen applied during de senescence on two rice varieties: evaluation of nitrate reductase and glutamine synthetase activities and crude protein. *Physiol. Mol. Biool. Plants*, v.8(1), 87-95. 2002.
- TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solos, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 174p.
- TRUEMAN, L. J.; RICHARDSON, A.; & FORDE, B. G. Molecular cloning of higher plant homologues of the high-affinity nitrate transporters of *Clamydomonas reinhardtii* and *Aspergillus nidulans*. *Gene*, v.175, p.223-231, 1996.
- VERMA S.K.; KHANNA V.; SINGH N. Random amplified polymorphic DNA analysis of Indian scented basmate rice (*Oryza sativa* L.) germoplasma for identification variability and duplicate accessions, if any. *Eletrophorese*. Jun. v. 20, n. 8, p. 1786-9, 1999.
- 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 transporters from roots of *Hordeum vulgare*. *Plant Physiology*, v.122, p.783-792, 2000.
- VIRK, S.P.; BRIAN V.F.L.; MICHAEL T.J.; NEWBURY, J.H. Use of RAPD for the study of diversity with plant germoplasm collections. *Heredity*, vol. 74, p.170-179, 1994.
- WANG, R., LIU, D., AND CRAWFORD, N.M. The arabidopsis CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.95, p.15134-15139, 1999.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; KAHL, G. Methodology. In: DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications. 2^a ed. London: CRC Press, 2005. Cap. 4, p. 81-205.
- WETSEELAR, R. Capillary movement of nitrate towards tropical soil surfaces. *Nature*, v.186, p. 572-573. 1970.
- WETSELAAR, R. Nitrate distribution in tropical soils. I. Possible cause of nitrate accumulation near the surface after a long dry period. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.15, p.110-120, 1961a.
- WETSELAAR, R. Nitrate distribution in tropical soils. II. Extent of capillary accumulation of nitrate during a long dry period. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.15, p.121-133, 1961b.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELICK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful a genetic marker. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WIRTH, J.; CHOPIN, F.; SANTONI, V.; VIENNOIS, G.; TILLARD, P.; KRAPP, A.; LEJAY, L.; DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. Regulation of root nitrate uptake at the NRT2.1 protein level in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 32, p. 23541-23552, 2007.
- XAVIER, R. G. Estudo da ocupação nodular de Rizóbio em genótipos de Caupi (*Vigna unguiculata* L. walp) agrupados pela técnica de RAPD. 2000. 123p. Dissertação (Mestrado em Agronomia Ciência do Solo). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2000.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. *Anal.Biochem*, San Diego, CA - USA, v.80, p.209-213, 1955.

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

ZHOU, J.; THEODOULOU, F. L.; MUL DIN, I.; INGEMARSSON, B. & MILLER, A. J. Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *The Journal of Biological Chemistry*, v.273, n.20, p.12017-12023, 1998.

ZHUO, D.; OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; & GLASS, A. D. M. Regulation of putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2; 1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, v.17, n.15, p.563-568, 1999.