

UFRRJ

INSTITUTO DE AGRONOMIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

TESE

**Absorção e Assimilação de Amônio em Duas Variedades
de Arroz: uma Integração entre o Metabolismo de
Nitrogênio e de Carbono**

Rodrigo Grazinoli Garrido

2007



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

**ABSORÇÃO E ASSIMILAÇÃO DE AMÔNIO EM DUAS VARIEDADES
DE ARROZ: UMA INTEGRAÇÃO ENTRE O METABOLISMO DE
NITROGÊNIO E DE CARBONO**

RODRIGO GRAZINOLI GARRIDO

Sob a Orientação do Professor Dr.
Manlio Silvestre Fernandes

Co-orientação da Profa. Dra.
Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2007

633.18
G241a
T

Garrido, Rodrigo Grazinoli, 1978-
Absorção e assimilação de amônio em duas variedades de arroz: uma integração entre o metabolismo de nitrogênio e de carbono / Rodrigo Grazinoli Garrido. – 2007.

65 f. : il.

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

Bibliografia: f. 46-53.

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

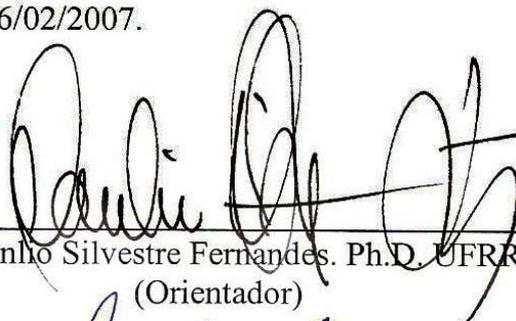
É permitida a cópia parcial ou total desta tese, desde que seja citada a fonte.

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

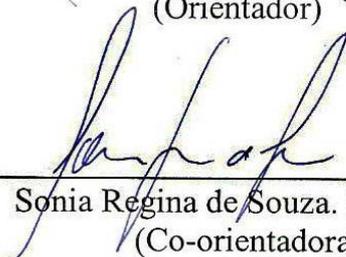
RODRIGO GRAZINOLI GARRIDO

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

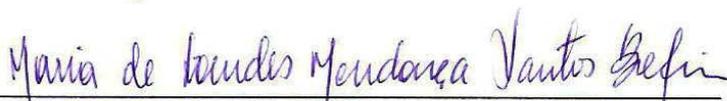
TESE APROVADA EM 16/02/2007.



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



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



Maria de Lourdes Mendonça Santos Brefin. Dr. CNPS



Leonardo Oliveira Medici. Dr. UFRRJ



Ricardo Felipe Alves Moreira. Dr. UNIRIO

DEDICATÓRIA

*Dedico essa Tese à Profa. Dra. Fabíola de Sampaio
Rodrigues Grazinoli Garrido pelo apoio e
entusiasmo incondicionais.*

*Sobre o pouco fostes fiel,
sobre o muito te colocarei.
Mt 25,23*

AGRADECIMENTOS

A CAPES pelo fomento;
Ao CPGA-CS pela paciência e compreensão;
A Profa. Dra. Lúcia dos Anjos pelo estímulo e atenção constantes;
Aos colegas do Laboratório de Bioquímica de Plantas e de Nutrição Mineral de Plantas pelo convívio pacífico;
Ao colega Wagner por orientar os experimentos com a PFK;
A meu aluno Felipe por ter suscitado em mim um orientador;
Ao Prof. Dr. Leonardo Médici pela eterna disposição de conversar e por ter ensinado o que sei sobre Fisiologia Vegetal. – Se aprendi pouco, a culpa é minha!
Ao Prof. Dr. Roberto Oscar Rossiello por fazer o meu convívio no CPGA-CS mais amigável;
Ao Prof. Dr. Antônio Galina pelas discussões sobre bombas de prótons e pela disposição de realizar alguns ensaios;
Ao Prof. Dr. Mauro Sola-Penna pela oportunidade de fazermos os ensaios com a PFK;
Aos componentes da banca pelo aceite, apesar da data imprópria;
À Profa. Dra. Sonia Regina de Souza pela orientação e o convívio respeitoso quando fomos colegas de docência;
Ao Prof. Dr. Manlio Silvestre Fernandes pela orientação dos trabalhos de Tese. Agradeço também pelas conversas oportunas sobre educação e C&T, oportunidades peculiares para aprender um pouco das políticas governamentais e institucionais vivenciadas por ele.

BIOGRAFIA

Rodrigo Grazinoli Garrido nasceu em Petrópolis-RJ, em 26/09/1978. Graduou-se em Biomedicina pela UNIRIO em 1999, defendendo monografia intitulada *Estudos preliminares da atividade do isômero ADA1 da adenosina desaminase em eritrócitos humanos como diagnóstico da tuberculose pulmonar*. Estudo que vinha desenvolvendo desde o segundo ano da graduação. Iniciou mestrado em Ciências Farmacêuticas na UFRJ ainda em 1999, onde, em 2001, defendeu a tese *Atuação de solventes orgânicos na catálise homogênea pela pirofosfatase inorgânica citosólica de leveduras*. Já no ano de 2000, era aprovado em concurso público para o cargo de Perito Criminal, na PCERJ. Nesse cargo, vem atuando desde então, especializando-se em Identificação Humana por DNA e Entomologia Forense e chegando à Chefia do Serviço de Perícia de Petrópolis. Em 2001, foi aprovado para Professor Substituto de Bioquímica na UFRRJ e para tutor da então vanguardista Licenciatura em Ciências Biológicas à distância do Centro de Ensino Superior à Distância do Estado do Rio de Janeiro (CEDERJ). Atuou por volta de 2 anos nestas atividades docentes, alcançando a Coordenação do Curso de Biologia do Cederj em Petrópolis e lecionando Bioquímica, prática e teórica, para diversos cursos de graduação na UFRRJ. Ainda como Professor, ensinou no Centro Federal de Educação Tecnológica de Química (CEFET-Química) Bioquímica, Processos Bioquímicos e Fitoterapia para cursos técnicos e superiores. No ano de 2002, concluiu o curso de Especialização em Análises Clínicas na UNIGRANRIO, onde defendeu o trabalho *Diagnóstico bioquímico da tuberculose através da atividade da adenosina desaminase* retornando aos estudos iniciados na graduação. Em 2003, foi aprovado para o curso de Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo na UFRRJ, onde elaborou a tese ora apresentada. Além dos trabalhos de tese, durante o doutorado, Rodrigo desenvolveu estudos a que resultaram em uma publicação pela EMBRAPA e um capítulo na coleção de Criminalística mais respeitada do país, abrindo espaço para a Ciência do Solo no “desvendando de crimes”. Sua carreira diversificada já o rendeu doze trabalhos publicados em periódicos especializados. Entre eles, trabalhos originais, resenhas e revisões. Além disso, possui vinte e quatro textos em jornais de notícias abordando as relações da degradação do meio ambiente com a saúde humana e dezoito trabalhos resumidos e completos publicados em anais de eventos. Em 2005 licenciou-se em Biologia e recebeu o título de Bioeticista pela UFLA, apresentando o trabalho: *Considerações Éticas e Operacionais para uma Agricultura Sustentável*. Nos últimos anos, vem sendo convidado a ministrar palestras e conferências em encontros científicos nacionais e internacionais, além de figurar, rotineiramente em entrevistas sobre Criminalística em diversos jornais.

RESUMO

GARRIDO, Rodrigo Grazinoli. **Absorção e assimilação de amônio em duas variedades de arroz: uma integração entre o metabolismo de nitrogênio e de carbono.** 2007. 53f (Tese, Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Aproximadamente metade da população do planeta depende do arroz. No Brasil, a cultura desse cereal é largamente difundida, sofrendo a influência de severas condições climáticas como ocorre no Trópico Úmido. Nessa região, certamente, o fator mais limitante para a cultura do arroz é a disponibilidade de nitrogênio. No entanto, ainda pesam sobre a cultura a baixa insolação e os solos ácidos com alta saturação de Al^{+3} . Nesses solos, o amônio pode ser a única fonte de nitrogênio mineral para as plantas. Sua assimilação é econômica e rápida, porém, demanda estreita integração com o metabolismo de C. Pretendeu-se neste trabalho, reconhecer esta integração. Foi utilizada a variedade de arroz Piauí, adaptada às condições ambientais do Trópico Úmido, e a variedade melhorada IAC-47, selecionada sob altos teores de N. Os ensaios foram feitos em plântulas com 26 dias após a germinação (DAG) cultivadas em solução de Hoagland e Arnon (1950) modificada com doses de 0,1 mM e 1,0 mM de $N-NH_4^+$. Avaliou-se a atividade de H^+ ATPases de plasmalema (P); H^+ ATPases de vacúolo (V); H^+ PPases de vacúolo (V) e das enzimas glutamina sintetase (GS), glutamato sintase (GOGAT) e glutamato desidrogenase (GDH) responsáveis pela assimilação de nitrogênio. Além disso, acompanharam-se os teores de açúcares livres, N-amino, $N-NH_4^+$, N-total, massa fresca e massa seca e a variação do pH e do $N-NH_4^+$ da solução nutritiva. Foi ainda medido o comprimento da raiz seminal e o fluxo glicolítico através da atividade da enzima fosfofrutocinase (PFK) do tecido radicular das plantas. A atividade das $P-H^+$ ATPases mostrou-se maior nas plantas IAC-47. No entanto, a variedade Piauí mostrou maior teor de proteína na fração microsomal, maior atividade $V-H^+$ ATPases e maior desenvolvimento de raízes, o que possibilitou uma absorção de amônio semelhante à da planta melhorada. Ambas as variedades apresentaram maior acúmulo de massa fresca na parte aérea e decaimento na relação raiz/parte aérea no tratamento com 1,0 mM $N-NH_4^+$. Observou-se acúmulo de N-amino e $N-NH_4^+$ na parte aérea de plantas Piauí no tratamento 1,0 mM de $N-NH_4^+$. Tanto a parte aérea quanto a raiz da variedade Piauí cultivada a 1,0 mM $N-NH_4^+$ apresentaram menor acúmulo de açúcares solúveis e maiores teores de clorofila a+b. A atividade da PFK em todas as plantas foi aumentada com os níveis de amônio nutricionais. A variedade Piauí apresentou sempre menor oxidação de açúcares. A variedade adaptada pareceu concentrar seus açúcares possivelmente para disponibilidade em estádios posteriores de enchimento de grão. Para isso, manteve um maior *pool* de amônio e N-amino. Houve indícios de que o amônio absorvido por plantas Piauí cultivadas no tratamento 1,0 mM $N-NH_4^+$ teria sido drenado pela ação aminativa da enzima GDH, que se mostrou exacerbada. No entanto, a função desaminação da GDH também se mostrou aumentada. Dessa forma, a Piauí poderia ter utilizado-se da GDH como via anaplerótica para regular a necessidade de esqueletos carbônicos. A atividade de GS foi maior para a variedade IAC-47, acompanhada da atividade de GOGAT de parte aérea no tratamento 1,0 mM $N-NH_4^+$. As plantas IAC-47 assimilaram o amônio prontamente a partir da via GS/GOGAT, a qual foi alimentada pela glicólise acelerada. Essas plantas produziram proteína constitutiva não aplicando em reservas para o posterior enchimento do grão.

Palavras-chave: *Oryza sativa*. $N-NH_4^+$. Glicólise

ABSTRACT

GARRIDO, Rodrigo Grazinoli. **Ammonium absorption and assimilation in two rice varieties: carbon-nitrogen metabolism integration.** 2007. 53p (Thesis, Doctor Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

About half of planet population depend on rice. In Brazil, this cereal crop is widely spread, and influenced by harsh climate conditions such as Humid Tropics' one. In this region, certainly nitrogen is the most limiting nutrient. However, low insolation, acid and highly Al^{3+} saturated soils still endangers the culture. In these soils, ammonium can be the single plant's Nitrogen source for plants. Its assimilatory pathway is economic and fast, although it presents strong integration with C metabolism. This work intended to recognize ammonium assimilation integrated with carbon metabolism. Two rice varieties were used: one adapted to Humid Tropics environment - Piauí - and an improved variety represented by IAC-47, selected under high N levels. Assays were carried on with 26 days after emergency plants, cultivated in Hoagland and Arnon (1950) modified solution with N-NH_4^+ 0.1 mM and 1.0 mM N-NH_4^+ . Plasmalemm (P)- H^+ ATPases; vacuole (V)- H^+ ATPases; vacuole (V)- H^+ PPases activity as well as glutamine synthetase (GS), glutamate synthase (GOGAT) and glutamate dehydrogenase (GDH) were analysed. Moreover, it was determined soluble sugars, amino-N, N-NH_4^+ , total-N, fresh and dry weight, and nutrition solution pH and N-NH_4^+ variation. Also, seminal root length was measured as well as glycolysis was analyzed through phosphofructokinase (PFK) activity at plants' roots tissue. P-H+ATPases activity was higher in IAC-47 roots. On the other hand, at Piauí roots, enhances at microsomal protein were observed, and V-H+ATPases presented higher activity as well as root development was high. This allowed the adapted variety to absorb N like the improved one. However, both varieties accumulated fresh weight in shoots at treatment 1.0 mM N-NH_4^+ and showed roots/shoots decrease at the same treatment. Moreover, amino-N and NH_4^+ concentration was higher at Piauí shoots under 1.0 mM N-NH_4^+ . Both Piauí shoots and roots cultivated under 1.0 mM N-NH_4^+ accumulated less soluble sugars. Also, Piauí shoots had higher a+b chlorophyll concentration. PFK activity was enhanced at every plant, what accompanied ammonium levels. Piauí plants always presented low sugar oxidation levels. It also seemed to concentrate its sugars. Probably it happened to later availability for grain fullfil. To ensure this, it has high ammonium and amino-N pools. Nitrogen absorbed by 1.0 mM N-NH_4^+ Piauí seemed to be substrate for GDH-amination, wich activity was superior. Despite this, GDH deamination was high. In this way, Piauí could have GDH activity as an anaplerotic pathway to regulate C skeletons need. Meanwhile, GS increases were observed at IAC-47, toghether with GOGAT increases at 1.0 mM N-NH_4^+ shoots. IAC-47 assimilated ammonium at GS/GOGAT pathway, wich was fed by glycolysis velocity. These plants would produce constitutive protein, what doesn't mean later grain stock.

Key words: *Oryza sativa*. N-NH_4^+ . Glicolysis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Morfologia do Arroz e seu Cultivo no Brasil.....	3
2.2	Dinâmica do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas.....	5
2.3	Absorção de Amônio.....	7
2.4	H ⁺ ATPase de Membrana Plasmática.....	10
2.6	H ⁺ PPase de Tonoplasto.....	13
2.7	Assimilação de Amônio em Plantas.....	14
2.8	A Glicólise.....	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Escolha de Variedades.....	19
3.2	Tratamento Estatístico dos Dados.....	19
3.3	Germinação e Plantio das Sementes.....	19
3.4	Cultivo das Plantas de Arroz.....	19
3.5	Ensaio Cinético de Absorção de NH ₄ ⁺	20
3.6	Purificação da P-H ⁺ ATPase, V-H ⁺ ATPase e V-H ⁺ PPase.....	20
3.7	Atividade da P-H ⁺ ATPase.....	21
3.8	Atividade da V-H ⁺ ATPase.....	21
3.9	Atividade da V-H ⁺ PPase.....	21
3.10	Purificação da Glutamina Sintetase (GS), Glutamato Sintase (GOGAT) e Glutamato Desidrogenase.....	21
3.11	Atividade da Glutamina Sintetase (GS).....	22
3.12	Atividade da Glutamato Sintase (GOGAT).....	22
3.13	Atividade da Glutamato Desidrogenase em sua Função Aminativa (GDH).....	22
3.14	Atividade da Glutamato Desidrogenase em sua Função de Desaminação (GDH-desaminação).....	22
3.15	Maceração das Amostras para Extração Alcoólica e Partição com clorofórmio para a Determinação dos Teores de N-amino livre, NH ₄ ⁺ e Açúcares Solúveis.....	22
3.16	Determinação de N-total por Digestão Sulfúrica, Arraste a Vapor e Titulação.....	23
3.17	Purificação da Fosfofrutocinase (PFK) e Frutose 6-p 1-fosfotransferase (PFP).....	23
3.18	Atividade da Fosfofrutocinase (PFK) e Frutose 6-p 1-fosfotransferase (PFP) pelo Método Calorimétrico (Método Acoplado).....	23
3.19	Medição do Comprimento da Raiz Seminal.....	23
3.20	Determinação das Concentrações dos Pigmentos Fotossintetizantes.....	23
4	RESULTADOS e DISCUSSÃO	24
4.1	Absorção de Amônio em Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47.....	24
4.2	Desenvolvimento de Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47 em Resposta à Nutrição Amoniacal.....	30
4.3	Frações Solúveis, Pigmentos e Fluxo Glicolítico de Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47 cultivadas a 0,1 e 1,0 mM de N-Amônio.....	35
4.4	Regulação da Assimilação de Amônio em Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47 e sua Integração como Metabolismo de C.....	40
5	CONCLUSÃO	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

LISTA DE SÍMBOLOS

SIGLA	EXTENSO
(Os)(At)AMT	Transportador de Amônio de (<i>Oryza sativa</i>) (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
2OG	2-oxoglutarato (α -cetoglutarato)
AKT	Transportador de potássio de <i>Arabidopsis</i>
ATP, ADP, AMP	(Tri)(di)(mono)fosfato de adenosina
BTP	1,3-bis[tris(hidroximetil)metil-amino]propano
BSA	Albumina Sérica Bovina
CoA	Coenzima A
CTC	Capacidade de Troca Catiônica
$\Delta\Psi$	Diferença de potencial transmembrana
DAG	Dias Após a Germinação
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
Fd	Ferredoxina
GATA	Guanina-adenina-timina-adenina-
GDH	Glutamato Desidrogenase
GOGAT	2-oxoglutarato aminotransferase (Glutamato Sintase)
GS	Glutamina Sintetase
GTP	Trifosfato de Guanosina
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
K_M	Constante de Michaelis-Menten
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade
MEP	Metilamônio permease
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico
MOPS	Ácido 3-(N-Morpholino)propanosulfônico
$NAD^+(H)$	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidado (reduzido)
$NADP^+(H)$	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato oxidado (reduzido)
PEP	Fosfoenolpiruvato
PFK	Fosfofrutocinase
$P-H^+ATPase$	H^+ -ATPase de plasmalema
$V-H^+ATPase(PPase)$	H^+ -ATPase vacuolar (H^+ -Pirofosfatase vacuolar)
PK	Piruvato cinase
(P)Pi	(Piro)Fosfato Inorgânico
PMSF	Polimetilssulfonil fluoreto
PFP	Frutose-6-fosfato 1-fosfotransferase (PPi-PFK)
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SAT	Transportador de Amônio Simbiótico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)-propano-1,3 diol

1 INTRODUÇÃO

De acordo com dados do Instituto Internacional de Pesquisa do Arroz (IRRI), cerca da metade da população do planeta, mais de três bilhões de pessoas, dependem do arroz para a nutrição (IRRI, 2007). O papel desse cereal na dieta alimentar do povo brasileiro é ainda de maior destaque. Virtualmente, o arroz é consumido por todas as classes sociais, mas, predominantemente, por aquelas de renda mais baixa (Yokohama, Rucatti e Kluthcouski, 1999). O Brasil ainda é um dos maiores importadores desse produto. Nos últimos anos, as importações de arroz alcançaram até 2.000.000 Mg ano⁻¹, provenientes principalmente de países do Mercosul. (IBGE, 2007).

A discussão torna-se ainda mais promissora quando se verifica que a cultura do arroz é largamente difundida por todo o Brasil e, por isso, é uma das mais influenciadas pelas condições climáticas, variadas em latitudes que vão desde 5° Norte até 33° Sul (Steinmetz et al., 1999). O sistema de cultivo de arroz predominante no Brasil é o de sequeiro em terras altas (Arf et al., 2002). No entanto, em virtude da dispersão continental da cultura, o arroz está sujeito à grande amplitude de temperaturas, com intensa variabilidade na oferta de radiação solar, principalmente pela variação do fotoperíodo, bem como na disponibilidade hídrica. Vale lembrar ainda que variações climáticas deste porte influenciam também na formação dos solos, implicando diretamente no sistema de cultivo utilizado, como é o caso da cultura do arroz no início da época de chuvas na Baixada Maranhense (Fernandes, 1990).

Nessa região, as características climáticas do Trópico Úmido, com chuvas concentradas entre os meses de dezembro e julho e acompanhadas de baixa insolação e temperaturas (Rodrigues e Grazinoli-Garrido, 2005), fazem com que o plantio do arroz coincida com o início do período chuvoso (Agritempo, 2005). São comuns em áreas sob a influência dessas condições ambientais solos ácidos e fortemente ácidos, de baixa fertilidade natural e, freqüentemente com alta saturação de alumínio (Moraes, 1999).

Certamente, o fator da fertilidade mais limitante para a cultura do arroz é a disponibilidade de nitrogênio, o que faz com que despesas com fertilizante nitrogenado impliquem na maior parte dos gastos da produção (Buresh e De Datta, 1991) e em sérios riscos ambientais (Rodrigues e Grazinoli-Garrido, 2005).

Sob as condições do Trópico Úmido, o N na forma nítrica é facilmente lixiviado do solo (Rodrigues e Grazinoli-Garrido, 2005). No entanto, nos solos dessa região, em virtude do baixo pH e excesso de alumínio, a forma amoniacal pode surgir pela inibição da nitrificação (Fernandes, 1990). Assim, em certas circunstâncias, o NH₄⁺ pode ser a única fonte de nitrogênio mineral para as plantas (Britto et al., 2001a).

Além disso, para aproveitar-se da época das chuvas, a fase vegetativa do arroz, até cerca de trinta dias após a sua germinação, por volta do mês de fevereiro, sofre com as quedas na intensidade luminosa (Agritempo, 2005).

É sabido que a assimilação do nitrogênio amoniacal é rápida e mais econômica, porém demanda perfeita interação com o metabolismo de carboidratos a fim de sustentar a pronta disponibilidade de esqueletos carbônicos e energia necessária no processo. Para entender melhor como ocorre essa integração metabólica em plantas crescidas nas condições de baixas concentrações de nitrogênio, especialmente na forma amoniacal, e baixos níveis energéticos de luz, o presente trabalho procurou analisar a absorção e assimilação de NH₄⁺ e a regulação da glicólise, principal via na produção de trifosfato de adenosina (ATP) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NADH) necessários para a assimilação desse cátion, principalmente nos tecidos não fotossintetizantes, como a raiz. Na nutrição amoniacal, esse órgão, além da absorção, é especialmente responsável pela assimilação do nitrogênio, onde esse metabolismo ocorre principalmente no citossol.

Foram utilizadas nesse experimento duas variedades de arroz: Piauí e IAC-47. A variedade Piauí é adaptada às condições ambientais do Trópico Úmido e a IAC-47 melhorada. Essas plantas apresentam tolerância a Al^{+3} e a Piauí teores elevados de proteína no grão (Ferraz Jr et al., 2001). As plantas Piauí adaptadas às condições ambientais do Trópico Úmido apresentariam melhor eficiência no uso do nitrogênio, o que estaria relacionada à maior eficiência na assimilação, uma vez que tais plantas não teriam sido melhoradas sob pressão de elevados níveis de N, como acontece com a IAC-47 (Ferraz Jr et al., 1997).

As plantas melhoradas mostram maior capacidade de absorção de N (Ferraz Jr et al., 1997), apresentam temperatura base de $10^{\circ}C$ (Steinmetz e Meireles, 1999) e produtividade em torno de $4,5 \text{ Mg ha}^{-1}$ com um índice de área foliar médio de 4 m^2 de folha $\cdot \text{ m}^{-2}$ de terreno em condições ideais de irrigação (Pinheiro, 1999).

Para simular as condições encontradas no Trópico Úmido, as plantas de arroz utilizadas nesse trabalho foram cultivadas até 26 dias após a germinação, em níveis energéticos baixos de luz e concentrações baixas de $N-NH_4^+$ (0,1 mM e 1,0 mM). Esperou-se abranger níveis de transportadores de alta afinidade (HATS). Objetivou-se elucidar os parâmetros de absorção e assimilação do amônio, bem como sua integração com o metabolismo de carbono nas condições descritas. Para tanto, foram avaliados os seguintes parâmetros: atividade de H^+ ATPases de plasmalema (P- H^+ ATPases), H^+ ATPases e H^+ PPases vacuolares (V- H^+ ATPases e V- H^+ APPases) e de enzimas do metabolismo de assimilação de nitrogênio, Glutamina Sintetase/Glutamato Sintase (GS/GOGAT) e Glutamato desidrogenase (GDH). Além disso, as alterações no metabolismo foram acompanhadas pela avaliação simultânea dos teores de açúcares solúveis, N-amino livre, $N-NH_4^+$, N-total, massa fresca e seca e pigmentos das plantas.

Para avaliar o metabolismo de carbono nas plantas foi analisada a glicólise. As alterações no metabolismo glicolítico foram estabelecidas através da análise da atividade da fosfofrutocinase (PFK), dependente de (ATP) e de pirofosfato (PPi), importante enzima regulatória dessa via em tecidos não verdes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia do Arroz e seu Cultivo no Brasil

O gênero *Oryza* é composto por 22 espécies, sendo duas cultivadas: *O. sativa* em todo o mundo e o *O. glaberrima* em algumas regiões do Oeste da África, e as outras vinte espécies são silvestres, das quais quatro ocorrem no Brasil: *O. latifolia*, *O. alta*; *O. grandglumis* e *O. glumaepatula* (da Silva et al., 1999). Essas Monocotiledôneas da família *Poaceae* caracterizam-se por possuir caules ocos, flores reduzidas de cor verde e aquênios especializados ou cariopses como frutos (Cronquist, 1968). O presente trabalho abordará a primeira espécie das cultivadas: *O. sativa*.

De modo geral, pode-se caracterizar morfológicamente a planta de arroz como se segue (Pinheiro, 1999):

- A raiz seminal, ou radícula, oriunda da coleorriza é seguida por uma ou duas raízes seminais secundárias, todas com raízes laterais. Após um curto período de tempo passado da germinação, estas são substituídas pelo sistema secundário de raízes adventícias, possuindo muitas ramificações e pêlos.
- A folha primária, surgida do coleóptile, difere das demais por ser cilíndrica e não apresentar lâmina. As folhas posteriores, entre oito e quatorze, são dispostas de forma alternada, envolvendo o colmo, onde se observa a bainha. Da junção da bainha com a parte pendente situa-se o colar, do qual emergem dois pequenos apêndices (aurículas) e uma estrutura membranosa (lígula). A última folha a surgir em cada colmo denomina-se folha-bandeira.
- O caule é composto por um colmo principal e um número variável de colmos primários e secundários, ou perfilhos. O caule verdadeiro encontra-se na base do perfilho sendo visualizado apenas com o distanciamento de nós no período reprodutivo do vegetal.
- A inflorescência da planta de arroz denomina-se panícula. Localiza-se sobre o último entrenó do caule e é explicitada pela folha-bandeira. É composta pela ráquis principal, de onde saem as ramificações primária, que originam as ramificações secundárias, das quais surgem as espiguetas com dois pares de brácteas. O par de brácteas inferior ou estéril é rudimentar e o superior apresenta em seu interior a flor propriamente dita com um pistilo, contendo um óvulo, e seis estames.
- O grão é formado pelo ovário fecundado, contendo uma única semente aderida às suas paredes (pericarpo). É envolvido pelas glumas do par de brácteas superior (pálea e lema) que, juntamente com as glumas estéreis, formam a casca.

O surgimento de cada órgão e sua função pode ser vislumbrado a partir do conhecimento do ciclo de vida do vegetal. O ciclo de vida da planta de arroz pode ser dividido em três fases distintas: fase vegetativa, fase reprodutiva e fase de maturação (Vergara e Chang, e Lilis, 1969; Vergara, 1970). Nestas fases, são observadas modificações metabólicas e no padrão de absorção de nutrientes.

A fase vegetativa corresponde ao período entre a germinação da semente e a iniciação da panícula, sendo modificada pela temperatura e pelo fotoperíodo (Pinheiro, 1999). São essencialmente ligadas a esta fase as diferenças varietais na duração do crescimento, uma vez que a emissão de perfilhos e a diferenciação das folhas ocorrem nessa fase, onde os nutrientes são absorvidos intensamente e carboidratos e proteínas são sintetizados de forma a sustentar os processos posteriores (Vergara e Chang, e Lilis, 1969; Vergara, 1970).

A fase reprodutiva, que vai da iniciação da panícula ao florescimento, tem duração em torno de 35 dias em condições tropicais (Vergara, 1970). Durante esta fase os fotoassimilados são transformados em componentes da parede celular, como lignina e celulose e o excesso é armazenado nos colmos e bainhas na forma de amido (Pinheiro, 1999).

A fase de maturação, ao final do ciclo de vida da planta de arroz, se inicia com o último evento da fase reprodutiva e termina com a maturação dos grãos, com uma duração entre 30 e 35 dias. Apesar da maioria dos fotoassimilados nos grãos ser proveniente da fotossíntese realizada nesta fase sabe-se que parte dos carboidratos, proteínas e minerais acumulados na bainha das folhas e no colmo antes do florescimento movem-se para as panículas e a planta torna-se senescente (Pinheiro, 1999).

O sucesso em cada fase do ciclo de vida, no que se refere à qualidade e à quantidade de carboidratos e proteínas produzidos e depositados pelo vegetal, deve-se em grande parte às combinações de luz e temperatura. Isto fica claro em trabalhos que avaliam o metabolismo e o crescimento de plantas de arroz frente a diferentes relações destes aspectos, combinados à forma e aos níveis de nitrogênio nutricionais (Fernandes, 1983 e 1984).

Essa discussão torna-se ainda mais promissora quando se verifica que a cultura do arroz no Brasil é largamente difundida por todo o território e por isso, é uma das mais influenciadas por essas condições climáticas, variadas em latitudes que vão desde 5° Norte até 33° Sul (Steinmetz et al., 1999).

Nosso país apresenta dimensões continentais, o que leva a elevada amplitude de temperaturas, com grande variabilidade na oferta de radiação solar, principalmente pela variação do fotoperíodo e na disponibilidade hídrica. Vale lembrar ainda que variações climáticas desse porte influenciam também na formação dos solos, implicando diretamente no sistema de cultivo utilizado. Esse é o caso da cultura do arroz nos solos hidromórficos ou aluviais, no início da época de chuvas na Baixada Maranhense (Fernandes, 1990).

O sistema de cultivo de arroz predominante no Brasil é o sequeiro em terras altas (Arf et al., 2002), que conta com três objetivos principais (Yokohama, Rucatti e Kluthcouski, 1999): i) Cultura de subsistência, normalmente associada ao cultivo itinerante, sendo o cultivo mais comum nas Regiões Norte e Nordeste; ii) Cultivo de transição visando a limpeza da área para outras finalidades, que predomina em regiões de fronteira agrícola, como as áreas de vegetação de cerrado ou floresta e antecede a implantação de pastagens como na Região Centro-Oeste; iii) Cultivo comercial em terras já cultivadas, de grande importância nas Regiões Sudeste e Sul e em regiões do Centro-Oeste favorecidas pela pluviosidade (sub região com influência amazônica).

A área cultivada do arroz de várzea, caracterizada pelo regime de inundações permanentes da lavoura, ainda é menor do que aquela do sistema de sequeiro. Contudo, a produção neste primeiro sistema já ultrapassa a do segundo, principalmente na Região Sul (Yokohama, Rucatti e Kluthcouski, 1999). Nesta região, particularmente, destaca-se a ocorrência de baixas temperaturas durante a fase reprodutiva do arroz irrigado, o que se destaca como um dos grandes problemas climáticos da cultura do arroz no Brasil, conjuntamente com a ocorrência de estiagens (veranicos), na região dos Cerrados, causando deficiência hídrica ao arroz de sequeiro (Steinmetz et al., 1999).

Entre as variedades cultivadas em terras altas, destaca-se a Piauí, adaptada às condições do Trópico Úmido (Ferraz Jr. et al., 2001). Nessas condições, observa-se baixa fertilidade do solo, que se apresenta ácido e com alta saturação de Al^{+3} , abaixamento da temperatura e da radiação solar, além de incremento no volume de chuvas no período de dezembro, quando é indicado o plantio do arroz, a julho (Rodrigues e Grazinoli-Garrido, 2005). Sob tais condições, as plantas Piauí tornaram-se tolerantes ao Al^{+3} e tornaram-se capazes de produzir teores elevados de proteína no grão (Ferraz Jr et al., 2001). A eficiência dessas plantas no uso do nitrogênio estaria relacionada à maior eficiência na assimilação do nutriente (Ferraz Jr et al., 1997).

Em contraposição, a variedade IAC-47 tem sido tradicionalmente cultivada em sequeiro, mas é produto de melhoramento genético sob condições ótimas de cultivo (Ferraz Jr et al., 1997). Essas plantas melhoradas mostram eficiência no uso do nitrogênio relacionada à maior capacidade de absorção de nutrientes (Ferraz Jr et al., 1997), apresentam temperatura base de 10 °C (Steinmetz e Meireles, 1999) e produtividade em torno de 4,5 Mg ha⁻¹ com um índice de área foliar médio de 4 m² de folha . m⁻² de terreno em condições ideais de irrigação (Pinheiro, 1999).

O arroz de sequeiro é cultivado no Brasil predominantemente nos Latossolos (Oxisols) e Argissolos (Alfisols/Ultisols), (Moraes, 1999). Estes solos apresentam características peculiares do ponto de vista químico: Os primeiros apresentam concentração de argila do tipo caulínica (1:1) e sesquióxidos livres, o que lhes confere baixa capacidade de troca de cátions (CTC). Na sua grande maioria possuem porcentagem de saturação de base menor que 50% (distróficos), o que caracteriza solos ácidos (pH 4,0 a 5,5). Além disso, a saturação de alumínio maior que 50% também é comum neste tipo de solo, mais por apresentar valores pequenos de cátions intercambiáveis (Ca, Mg, K e Na) do que por apresentar valores elevados de Al. Estas características fazem com que os Latossolos sejam de baixa fertilidade natural, confinando o crescimento das raízes das plantas ao horizonte superficial mais fértil, não aproveitando os nutrientes e água disponíveis nas camadas mais profundas do solo (Moraes, 1999).

Nos Argissolos, a saturação por Al também se mostra alta. Contudo, a disponibilidade de nutrientes nesses solos depende do material de origem. Os solos desenvolvidos a partir de rochas básicas são eutróficos (saturação de bases maior que 50%), podendo conter boa reserva dos principais nutrientes. Os originários de rochas ácidas, predominantes na região do Cerrado, são distróficos, contendo, assim, baixa reserva de nutrientes (Moraes, 1999).

Dessa forma, fica claro que o cultivo do arroz ocorre praticamente em todos os Estados de nosso país, e esse cereal ocupa uma posição de destaque na dieta alimentar do povo brasileiro, onde é consumido por todas as classes sociais, mas, predominantemente, por aquelas de renda mais baixa (Yokohama, Rucatti e Kluthcouski, 1999). Apesar disso, o Brasil ainda é um dos maiores importadores mundiais desse produto, dependendo da produção de outros países para manter o abastecimento interno (Yokohama, 1998). Nos últimos vinte anos, as importações de arroz apresentaram picos anuais que ultrapassaram as 2.000.000 Mg, oriundas principalmente da Argentina e do Uruguai (IBGE, 2007).

2.2 Dinâmica do Nitrogênio em Sistemas Agrícolas.

O ciclo do nitrogênio (N) na natureza é um dos que mais afeta as variadas formas de vida na Terra. O nitrogênio é um importante constituinte das chuvas, afeta o clima global e influencia as reações de síntese e o balanço de decomposição do ozônio na estratosfera. Na hidrosfera e na litosfera o nitrogênio é essencial para a nutrição de plantas e animais. Contudo, sua excessiva concentração pode acarretar problemas de eutrofização e intoxicação de organismos (Van Loon e Duffy, 2001).

Esse nutriente é essencial para a manutenção e acumulação de proteínas em plantas, alcançando até 4,77% da matéria seca de parte aérea de arroz aos 19 dias após o plantio (Fageria, 1998a). Sua absorção por parte dos vegetais superiores pode ser tanto na forma nítrica (NO₃⁻) quanto na amoniacal (NH₄⁺) (Britto et al., 2001a). Entretanto, a assimilação de nitrogênio somente ocorre na forma reduzida (Souza, Stark, e Fernandes, 2002).

Entre os gases que formam nossa atmosfera, N₂ ocupa uma posição privilegiada no que diz respeito à quantidade: 78%. Devido à grande estabilidade dessa molécula, em virtude de seu baixo potencial de ionização e alta energia de dissociação, só é observado seu carreamento para o solo pelo arraste através da chuva dos óxidos de nitrogênio produzidos por descargas elétricas (Fernandes, 1978).

Estima-se que na atmosfera 5×10^6 Mkg . ano⁻¹ de nitrogênio seja fixado, na forma de NH₃, por fenômenos naturais como descargas elétricas, raios cósmicos e energia proveniente do deslocamento de meteoros (Van Loon e Duffy, 2001).

Na atmosfera, o N amoniacal pode variar desde $6 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$, em regiões oceânicas, até $300 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ em locais livres de vento onde existem fontes de emissão, que são atualmente um problema ambiental de grande relevância. As culturas agrícolas são incluídas como uma das principais fontes de N para a atmosfera, seja pela corrente evapotranspiratória ou por gutação da forma amoniacal por parte das plantas. Essas trocas são dependentes do equilíbrio, em solução, entre as formas gasosa (NH₃) e a iônica (NH₄⁺) (Trivelin et al., 2002).

A maior parte do N disponível no solo para a nutrição das plantas é obtida através de fixação biológica (Fernandes; 1978), como aquela produzida pelas bactérias do gênero *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Barradas et al., 2001). Esse elemento pode coexistir tanto na forma orgânica, mais abundante, quanto mineral, sendo mais comuns a nítrica, a amoniacal e NO₂⁻ em condições especiais (Fageria; 1998b e Britto et al., 2001a).

O processo contrário, a desnitrificação, é efetuado por outros heterótrofos facultativos como bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Alcaligenes*. A partir de nitrogênio nítrico, oriundo da decomposição da matéria orgânica, produzem preferencialmente N₂ e N₂O em condições especiais de baixa taxa de oxigênio (Van Loon e Duffy, 2001). Já em solos alagados, como nas culturas inundadas de arroz, essas bactérias podem processar a desnitrificação até a liberação de NH₄⁺ (Fernandes, 1990).

O amônio tem sido subestimado como fonte de nitrogênio para as plantas. No entanto, em muitas áreas agricultáveis este cátion aparece em níveis milimolares na solução do solo, alcançando uma relação de 56 de NH₄⁺ para 1 de NO₃⁻, podendo, em certos solos, ser a única fonte de nitrogênio mineral para as plantas (Britto et al., 2001a).

O NH₄⁺ do solo surge da protonação da amônia - NH₃ (NH₃ + H₂O ↔ NH₄⁺ + OH⁻ pKa = 9,24), oriunda das desaminações da matéria orgânica em decomposição no solo (amonificação). Quanto à configuração estereoquímica, observa-se hibridização do orbital molecular do tipo sp³, minimizando as interações entre os pares eletrônicos ligantes no NH₄⁺ e entre os pares não ligantes da NH₃. As espécies neutras NH₃ e H₂O apresentam tamanhos semelhantes e momentos dipolares, respectivamente iguais a 1,47 D e 1,85 D, ambos sendo capazes de efetuar ligações de hidrogênio com outras moléculas. O raio iônico do NH₄⁺ é maior do que os raios do H₃O⁺, Li⁺ e Na⁺, igual ao do K⁺ e menor do que o raio do Rb⁺. Além disso, a amônia solubiliza-se muito melhor em meio orgânico do que o seu ácido conjugado NH₄⁺ (Howitt e Udvardi, 2000)

O NH₄⁺ é oxidado a NO₃⁻, em pequeno grau na faixa de pH normalmente encontrada nos solos (Britto et al., 2001a). Entretanto, NH₄⁺ pode ser acumulado onde houver inibição da nitrificação, como nos solos com excesso de Al, pH baixo ou no uso de inibidores de nitrificação (Fernandes, 1990). Já a forma nítrica é facilmente lixiviada do solo, principalmente em regiões de alta precipitação e temperaturas de solo elevadas, como é o caso do Trópico Úmido. De maneira diferente, as perdas da forma amoniacal baseiam-se na acentuada volatilização, mesmo após absorvida pelos vegetais, quando o NH₃ atmosférico estiver abaixo do ponto de compensação de amônio da planta (Trivelin et al., 2002).

Visto que o N é indispensável para a vida e principalmente para a produtividade de culturas agrícolas, mas se perde do solo facilmente por lixiviação, volatilização e desnitrificação, se faz necessário o uso adequado da adubação tanto do ponto de vista agrônomo como econômico (Fageria, 1998b).

Devido à carência de um método de análise que contemple todas as características desejadas para a avaliação de rotina do solo, o manejo adequado da adubação nitrogenada é tido como um dos mais difíceis. Dessa forma, não se pode preparar uma curva de calibração para este elemento. Resta como única alternativa para se fazer recomendação de adubação nitrogenada a determinação da curva de resposta em relação a várias doses deste nutriente (Fageria, 1998b).

Tomando-se como exemplo a adubação de cobertura em arroz de terras altas, esta se mostra como uma prática que proporciona resultados compensadores, sempre que a produtividade da lavoura esteja sendo limitada pelo suprimento deste nutriente (Fageria; 1998b). É possível utilizar suplementação foliar de nitrogênio na forma amoniacal (Souza et al., 1999). Nesse caso, o amônio pode ser absorvido após sua dissolução no filme de água que recobre a epiderme foliar e as cavidades estomáticas, principalmente com a formação do orvalho (Trivelin et al.; 2002).

A dose de N em cobertura geralmente recomendada para arroz de terras altas é de 20 a 30Kg. ha⁻¹, devendo ser realizada preferencialmente no início da diferenciação floral (Fageria; 1998b). Contudo, a aplicação de nitrogênio entre 10 e 20 dias após a antese pode proporcionar aumento na proteína do grão, sem perda de peso (Souza et al., 1999).

Quando o suprimento de N não é suficiente, as plantas amarelecem, iniciando-se pelas folhas mais velhas, podendo atingir toda a planta. Com a acentuação da deficiência, as folhas inferiores morrem, ficando com a coloração marrom-chocolate. O crescimento e o perfilhamento ficam prejudicados e a produtividade é reduzida drasticamente (Fageria; 1998a).

Deve-se tomar cuidado no diagnóstico visual, pois a deficiência de enxofre leva a sintomas semelhantes aos encontrados na deficiência de N. No caso do enxofre, se manifestam a partir das folhas mais novas, devido a imobilidade deste elemento na planta (Fageria; 1998a). Para se evitar este problema dá-se preferência ao uso de Sulfato de Amônio como adubo. Este sal, além de prover ambos os elementos (21% de N e 24% de S), apresenta ainda menor volatilização que a uréia como fonte de nitrogênio (Fageria; 1998b).

Indiscutivelmente, depois de carbono, oxigênio e hidrogênio, o nitrogênio é quantitativamente o mais importante elemento requerido por plantas e animais para o crescimento tanto na água como na terra. Alcança cerca de 1,5% do peso seco de inúmeras culturas agrícolas (Van Loon e Duffy, 2001). As vias de sua absorção e assimilação em plantas de arroz serão intensamente estudadas adiante, trazendo subsídios para a otimização de seus benefícios nesses vegetais.

2.3 Absorção de Amônio

Há cerca de 10 anos, a identificação dos transportadores de amônio em fungos, algas e plantas superiores guardava especial atenção para os fenômenos relacionados à cinética de absorção e aos efeitos fisiológicos da nutrição amoniacal. Admitia-se a existência de um uniporte passivo, possível de ocorrer inespecificamente pelo canal de K⁺, e, por isso, inibido por esse íon monovalente e por Rb⁺, com pH ótimo de 8,5, temperatura de máxima atividade variando entre 8 e 23°C e predominante em fases luminosas. Esse transporte apresentava valores de fluxo de 2,5 e 7,2 μmol . g⁻¹ . h⁻¹, respectivamente para cevada e trigo, alcançando 10,8 μmol . g⁻¹ . h⁻¹ sob condições deficientes de nitrogênio (Fernandes e Rossiello, 1995).

A possibilidade do transporte de amônio ocorrer pelo canal de K⁺, devido a uma similaridade de raio iônico e superfície hidratada, foi corroborada com a identificação desses transportadores KAT1 e AKT1 em *Arabidopsis*. O transporte inverso de K⁺ pelos transportadores de NH₄⁺ não se observa. A estrutura química, também pode explicar a possibilidade de ocorrer transporte de NH₃ em canais de água ou sua solubilidade na membrana plasmática. Contudo, na faixa de pH observada na maioria dos solos, essa espécie é encontrada em concentração insignificante para a nutrição de plantas (Howitt e Udvardi, 2000; Ludewig et al., 2002).

Além disso, já se conhecia a capacidade de inibição do transporte de NO₃⁻ promovida pelo NH₄⁺, explicada pela velocidade 4 a 5 vezes maior de absorção do cátion, ou pela diminuição da demanda de esqueletos de carbono promovida pela nutrição nítrica. Contudo, a capacidade do NO₃⁻ inibir o influxo de NH₄⁺ era cogitada em experimentos com *Brachiaria decumbens* mostraram que a adição de 5 mgKg⁻¹ de N-NH₄⁺ à adubação nitrogenada aumentaria a absorção de NO₃⁻ (Fernandes e Rossiello, 1995).

Atualmente, são bem descritas duas classes de transportadores de amônio: os transportadores de alta afinidade (HATS), muito ativos em baixas concentrações externas de NH_4^+ , sensível à inibição com saturação na faixa de $\mu\text{mol/L}$. E os transportadores de baixa afinidade (LATS), constitutivos e ativos em concentrações entre 1 e 40 mmol/L de amônio (Wang et al., 1994; Kuumar et al., 2003). Entre os HATS, foram identificadas em 1994, os genes MEP1 de *Saccharomyces cerevisiae* e AtAMT de *Arabidopsis thaliana* ambos responsáveis pela transcrição de transportadores de NH_4^+ . Hoje, já são conhecidos mais de 80 membros desses transportadores identificados em arqueobactérias, fungos, plantas e animais, dentre eles três genes membros da família AMT1, denominados AMT1.1; AMT1.2 e AMT1.3 (Wang et al., 2000; Van Dommelenet, de Mot e Vanderleyden, 2001; Williams e Miller, 2001; Kumar et al., 2003).

Estruturalmente, a família dos transportadores AMT de arroz apresenta similaridade de 83% entre as seqüências de aminoácidos do OsAMT1.1 e OsAMT1.3, 73% entre OsAMT1.1 e OsAMT1.2 e 68% entre OsAMT1.2 e OsAMT1.3. Apresentando respectivamente 532, 497 e 495 resíduos de aminoácidos (Kumar et al., 2003). Com exceção de uma proteína de *Arabidopsis* classificada como AMT2.1, os membros da família AMT/MEP apresentam alta hidrofobicidade, com massa em torno de 55KDa, homologia de aminoácidos superior a 70%, C-terminal citoplasmático e 11 ou 12 hélices transmembrana em sua estrutura (Howitt e Udvardi, 2000; Van Dommelenet, de Mot e Vanderleyden, 2001). O AMT1.1 apresenta C e N terminal extracitoplasmático, atípico aos transportadores secundários, derivados de uma topologia ancestral dotada de 12 hélices transmembrana, divididas em dois grupos de seis separados por um *loop* (Howitt e Udvardi, 2000).

Em algumas plantas como o arroz, o N-terminal do transportador apresenta características de receptor de sinal. Contudo, em todas as plantas observa-se uma estrutura muito conservada na família AMT. Tratam-se das hélices 5 e da 10, além do *loop* entre as hélices 5 e 6 (Howitt e Udvardi, 2000 e Van Dommelenet, de Mot e Vanderleyden, 2001).

O AMT2.1 apresenta estrutura primária com homologia bastante distante daquela encontrada para a família AMT1. Porém, em nível terciário e molecular, a similaridade se mantém, refletindo-se nos mecanismos. Outro transportador de amônio já descrito é o SAT1 (*Glycine max* transportador de amônio simbiótico), foi observado recentemente na membrana peribacterióide em nódulos de leguminosas infectadas por *Rhizobium* e vem sendo reportado por vários autores (Howitt e Udvardi, 2000; Van Dommelenet, de Mot e Vanderleyden, 2001).

Em arroz, a redução dos níveis de RNAm do gene AMT1.1 ocorreu em plantas tratadas com NO_3^- por até duas horas, contrariamente ao que se observou quando havia a troca dos sais nítricos pelos respectivos sais clorídricos. Esse fato corroborou a idéia da indução de transportadores de alta afinidade em baixas concentrações de NH_4^+ e a repressão desses genes com tratamentos nítricos (Wang et al., 2000). Isso poderia explicar as primeiras observações de inibição do influxo de NH_4^+ promovido pelo NO_3^- , contraditórias para a época (Fernandes e Rossiello, 1995).

Posteriormente, caracterizou-se a expressão dos três genes da família AMT1 em tecidos e espécies diferenciadas. O AMT1.1 apresenta K_M de 8 $\mu\text{mol/L}$, sendo específico de raiz em tomates e tendo seus níveis de RNAm aumentados em condições de baixa concentração de NH_4^+ . Sua repressão parece ser produzida por uma resposta retroativa aos níveis de glutamina, ou mesmo do próprio NH_4^+ citoplasmático, uma vez que o influxo é diminuído anteriormente à diminuição nos níveis de transcrição do RNAm. Enquanto isso, os AMT1.2 e AMT1.3 permanecem constantes frente à diminuição das concentrações externas do amônio. O AMT1.1 e o AMT1.2 apresentam resposta positiva à luz, podendo estar envolvidos na recuperação do NH_4^+ oriundo da fotorrespiração (Williams e Miller, 2001). A atividade ótima dos AMTs de *Arabidopsis* expressos em leveduras apresenta-se na faixa de pH 7,0, sendo decrescida de 50% em pH 5,0 ou pH 9,0 (Howitt e Udvardi, 2000).

A natureza ativa ou passiva do transporte de amônio promovido pelos membros da família AMT é exaustivamente discutida. Sabe-se que o influxo de NH_4^+ é retardado pela inibição das H^+ -ATPases da membrana plasmática, sendo carga dependente, mas não é afetado diretamente pela variação do pH externo (Howitt e Udvardi, 2000). Para o fluxo de (metil)amônio em bactérias tem-se estabelecido pelo menos cinco diferentes mecanismos de transporte: uniporte; simporte NH_4^+/H^+ ; simporte $\text{NH}_4^+/\text{Na}^+$; antiporte NH_4^+/K^+ e difusão facilitada de NH_3 , com a utilização da força proto-motora transmembrana gerada pelo gradiente de pH e pelo potencial de membrana ($\Delta\psi$) (Van Dommelenet, de Mot e Vanderleyden, 2001). Em plantas, pelo menos três mecanismos são cogitados: a difusão do NH_3 ; o uniporte de NH_4^+ e o simporte acoplado de NH_4^+/H^+ (Ludewig et al., 2002).

A determinação da diferença de potencial químico e elétrico entre o citoplasma e o meio extracelular tem sido utilizada para determinar a natureza ativa ou passiva do transporte de NH_4^+ . Células epidermais e corticais de raiz de arroz crescido a 2 $\mu\text{mol/L}$ e a 100 $\mu\text{mol/L}$ de amônio durante três semanas foram utilizadas para esse fim. Nas células das plantas crescidas a 2 $\mu\text{mol/L}$ houve a despolarização da membrana mais rápida após incremento de NH_4^+ externos. As células de ambas as plantas, apresentaram duas fase de despolarização de membrana similar ao comportamento do influxo de NH_4^+ , apresentando 50% de saturação em 21,8 $\mu\text{mol/L}$ e 35 $\mu\text{mol/L}$ respectivamente para as plantas crescidas a 2 e a 100 $\mu\text{mol/L}$, saturando completamente em concentrações maiores que 1 mmol/L (Wang et al., 1994).

Além disso, essas plantas apresentaram despolarização máxima de 2mV e 34,3mV e uma linearidade de despolarização e influxo de NH_4^+ em concentrações crescentes de 1 a 40mmol/L no meio externo com queda da despolarização em até 89% a partir da inibição específica das H^+ -ATPases. Essas evidências eletrofisiológicas apontariam para um influxo de NH_4^+ através de um processo ativo para os HATS, em um simporte com um próton, e passivo (ativo secundário) em altas concentrações (LATS) na forma de um uniporte eletrogênico por um canal específico para NH_4^+ ou inespecífico, para cátions (Wang et al., 1994).

Em estudos com AMT1.1 de tomate expresso em ovócitos de *Xenopus* verificou-se que este transportador é específico para amônio e metil-amônio, atuando como um uniporte, pH e voltagem independente. Verificou-se ainda a inexistência de um sítio para a ligação e hidrólise de ATP nos HATS, sugerindo uma prévia liberação de energia livre para o estabelecimento do processo (Ludewig et al., 2002). Pelo contrário, o transporte passivo promovido por LATS em arroz parece ser reversível em folhas e raiz e dependente de pH (Britto et al., 2001b).

Recentemente, a regulação promovida pelo status de nitrogênio e pelos níveis de luz nos três AMTs de arroz foi descrita. O aumento da concentração de NH_4^+ de 10 $\mu\text{mol/L}$ para 10 mmol/L promove um decréscimo do influxo de 8 para 1,24 $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$, após 72 horas. Concomitantemente a este efeito, observaram-se decréscimos de 6; 3,6 e 1,6 vezes, respectivamente, na transcrição de OsAMT1.1, OsAMT1.2 e OsAMT1.3. O efeito inverso apresentou total equivalência. Além disso, foi verificado um incremento de até três vezes na transcrição do OsAMT1.1 com o prolongamento dos períodos de luz, acompanhado modestamente pelo incremento nos níveis de RNAm dos outros dois transportadores (Kumar et al., 2003).

Em *Arabidopsis*, AMT1.2 parece ser o mais estável sofrendo brandamente os efeitos da variação do período luminoso e das concentrações de NH_4^+ externas e sendo conjuntamente com o AMT1.1 expresso na parte aérea, em maior grau nas folhas maduras. Enquanto isso, o AMT1.3 parece decair drasticamente com o fim do período de luz, que afeta em menor grau os outros transportadores, talvez pela queda na viabilidade de esqueletos carbônicos para a fixação do NH_4^+ (Gazzarini et al., 1999).

Dentro de uma mesma espécie vegetal, são observadas diferenças varietais na absorção do amônio e correlacionadas com a capacidade das plantas de adaptar-se a estresse. Em arroz, por exemplo, a variedade Bico Ganga crescida em baixas concentrações de nitrogênio (< 60 mg/L) apresenta um maior desenvolvimento radicular com concomitante

capacidade aumentada de absorver NH_4^+ . Contrário ao que é observado para a variedade Agulha. Essa apresenta menor desenvolvimento radicular e capacidade de absorver NH_4^+ apenas em condições de alta concentração de nitrogênio (Baptista, Fernandes e Souza, 2000). Em arroz inundado, cultivado a 100 μmol de N/L, foi observada diferente cinética de absorção de NH_4^+ de acordo com a idade da planta. Com até três semanas de idade, a absorção de NH_4^+ se mostrou mais expressiva que a de NO_3^- o que se inverteu na quarta semana (Kronzucker et al., 2000).

A regulação dos transportadores AMT parece alcançar os mais diversos níveis celulares. A regulação genética guarda especial importância na depressão dirigida por metabólitos das vias de assimilação de nitrogênio como a glutamina. Em bactérias, a indução e a repressão desses genes se fazem por meio de um sistema de regulação global de nitrogênio, envolvendo uridinilizações, proteína PII e cinases. Já em leveduras, a regulação dos genes dos transportadores MEP é promovida pelos níveis de nitrogênio celular através de duas famílias de fatores GATA de transcrição. Acredita-se que em plantas a regulação poderia ser estabelecida por um conjunto de proteína PII e fatores GATA (Howitt e Udvardi, 2000). Mais recentemente, estabeleceu-se que a regulação dos genes dos transportadores AMT em eucariotos se daria através de uma transdução de sinal dos níveis intracelular de nitrogênio por meio de uma proteína similar à PII (Van Dommelen et al., 2001).

Esses transportadores da família AMT parecem ainda sofrer regulação bioquímica, principalmente no que diz respeito à regulação paralela das vias de assimilação de nitrogênio como da enzima glutamina sintetase, e biofísica, relativa ao estabelecimento do potencial de membrana ($\Delta\psi$) e do gradiente de pH, em especial o promovido pela atividade das H^+ -ATPases (Howitt e Udvardi, 2000).

Outro nível onde há a possibilidade de regulação é o pós-transcricional. Este mecanismo promoveria uma regulação mais fina, envolvendo os sítios de cinase e fosforilação observados nesses transportadores. Além disso, o membro AMT1.1 parece possuir um sítio de regulação pelo AMPc e o de proteína cinase entre as hélices 7 e 8 (Howitt e Udvardi, 2000).

2.4 H^+ ATPase de Membrana Plasmática

As ATP sintetases (EC 3.6.1.35) são bombas eletrogênicas que geram potencial através de membranas biológicas por meio do transporte vetorial de prótons. Assim, proporcionam a força motriz para a absorção de nutrientes, para a biossíntese da parede celular, o transporte iônico, a ação hormonal, para resistir a doenças e para respostas ao estresse (Yoshida et al., 1983). Essas enzimas estão distribuídas em vários tipos de membrana, destacando-se a plasmalema, tonoplasto, retículo endoplasmático e as demais membranas de vesículas de endo e exocitose (Palmgren, 2001).

As próton-ATPases de membrana plasmática vegetal (P- H^+ ATPase) constituem uma família de bombas de prótons que formam um intermediário aspartil-fosfato em seu ciclo de reação e são inibidas especificamente por ortovanadato. Apresentam organização de domínios semelhante às H^+ ATPases de fungo; Na^+/K^+ ATPase animal; H^+/K^+ ATPase gástrica; Ca^+ ATPase de retículo sarcoplasmático; ATPase de metal pesado em bactérias e eucariotos e K^+ ATPase bacteriana (Palmgren, 2001).

Essa família de proteínas teve como primeiros genes clonados o AHA1 e AHA3 em *Arabidopsis*, na qual, atualmente, já se reconhecem 12 genes que revelaram a possibilidade de agrupamento de cinco famílias que transcrevem para diferentes isoformas dessas proteínas, com características catalíticas e regulatórias distintas (Palmgren, 2001).

Quando purificadas de membrana plasmática de beterraba, as H^+ ATPases apresentam estrutura dimérica com 225 kD e 218 kD quando em lipossomas reconstituídos. As H^+ ATPases atravessam a membrana plasmática expondo cerca de 70% de sua estrutura na face citoplasmática. Em *Neurospora* observam-se três domínios: A (N-terminal), P (Fosforilase) e N (Sítio de ligação do nucleotídeo). Além disso, já foi identificado um sítio

regulador da atividade dessas proteínas, situado na região C-terminal e denominado domínio R (Palmgren, 2001).

É discutível a existência de dois sítios de ligação de ATP com afinidades diferentes: um regulatório e outro catalítico, onde o segundo ligante promoveria o aumento da atividade da enzima por cooperação. Contudo, a avaliação de parâmetros cinéticos mostrou ser a simples cooperação entre os dois sítios não funcional. Isso leva a crer ser um único sítio, no qual o processo de fosforilação/defosforilação torna-se regulatório, com mudança na afinidade e mudança na taxa de catálise (Roberts e Beaugé, 1997).

O domínio R parece ser crucial para a regulação da atividade das P-H⁺ATPases, a fosforilação/defosforilação de seus resíduos de treonina (Thr 948 ou Thr 955) e de serina funcionam como um mecanismo regulatório, pois permitem a ligação, quando fosforilados, da proteína 14-3-3 e concomitante ativação da H⁺ATPase (Olsson et al., 1998 e Mandoux et al., 2000). Em milho, a fosforilação desses resíduos é mediada pela proteína fosfatase 2A (Colmoni, 2000). O mesmo incremento na ativação foi observado por uma proteólise controlada da P-H⁺ATPase de rabanete, com a retirada de um peptídeo de 10 kD pela tripsina (Rasi-Caldogov et al., 1993).

Após a interação P-H⁺ATPase/Proteína 14-3-3, o complexo pode ser mantido através da ligação com fusicocina em um sítio estabilizador gerado no próprio complexo, o que permitiria não só estabilizar mas, sobretudo, em uma concentração de 5 µmol/L, induzir a ativação da P-H⁺ATPase promovida pela proteína 14-3-3 (Olsson et al., 1998). O uso de um inibidor fosfatase, óxido de fenilarsina, conjuntamente com a fusicocina, levou a um decaimento drástico da indução da ativação da H⁺ATPase, bem como, na interação da proteína 14-3-3 e da própria fusicocina com a membrana plasmática (Olivari et al., 2000).

Em trigo, além de ativar o bombeamento de prótons, a fusicocina mostrou-se capaz de aumentar em até 12% as perdas de aminoácidos. A partir do monitoramento do N¹⁵, foram observados principalmente aminoácidos básicos, oriundos da parte aérea e direcionados para o espaço apoplástico da raiz em virtude da deficiência de nitrogênio. Contudo, os aminoácidos não são absorvidos, pois o cotransporte com H⁺ também estaria prejudicado. A perda de aminoácidos foi ainda mais marcante quando acompanhado de um aumento em dez graus centígrados na temperatura de crescimento (35°C dia / 25°C noite). Efeito contrário foi observado com o uso de vanadato (Rroço, Kosegarten e Mengel, 2002).

A catálise promovida pelas P-H⁺ATPases mostra uma estequiometria de 1:1 entre H⁺ bombeado e ATP hidrolisado, podendo variar em condições de estresses. Já se reconhece em seu mecanismo catalítico a formação de um complexo de transição entre a Asp 329 e o grupo γ-fosforil do ATP. Nesse complexo, uma carga negativa é estabilizada por uma carga positiva da Lys 569 e a segunda carga negativa é balanceada pela carga positiva do cofator íon metálico Mg²⁺, indispensável para a reação. Uma vez formado o intermediário aspartil-p, característica dessa família de enzimas, o Mg²⁺ e o ADP são liberados, com o consumo de uma molécula de água e posterior liberação do fosfato inorgânico (Pi). O H⁺ poderia ser transportado para o exterior mediante dois mecanismos: na forma de H₃O⁺, cercado por grupos coordenados ou como um cordão de prótons através da membrana. O mecanismo de ação, a organização das subunidades, bem como a origem evolutiva dessas proteínas diferem daqueles encontrados em V-H⁺ATPases (vacuolares) e nas F-H⁺ATPases (mitocondriais) (Palmgren, 2001).

Na presença de íons ferro, Fe²⁺ 100 µmol/L e Fe³⁺ 200 µmol/L, a hidrólise de ATP pela P-H⁺ATPase é inibida em até 90% em virtude da oxidação de grupos sulfidríla da enzima e da peroxidação de lipídios da membrana (Souza-Santos et al., 2001). Plantas sujeitas à deficiência de ferro mostraram um incrementado bombeamento de prótons nas áreas de alongamento da raiz. Contudo, ensaios imunocitoquímicos não mostraram efeito no número de H⁺ATPases (Schmidt, Michalke e Schikora, 2003).

Em plantas de trigo crescidas em pH 3,5 por até trinta dias, verificou-se que a catálise pela P-H⁺ATPase em meio com pH variando entre 5,6 e 6,2 e temperatura de 30°C, apresenta

um incremento de até 20% frente à catálise nas mesmas condições estabelecidas pela enzima de plantas controle crescidas em pH 7,0. Colocando o meio de reação em pH 7,0 as diferenças desaparecem. A P-H⁺ATPase proveniente das plantas crescidas em pH mais ácido apresentou ainda maior sensibilidade à variação do pH entre 7,0 e 6,4, apresentando atividade de 0,48 e 0,50 $\mu\text{mol Pi mg ptn}^{-1}\text{min}^{-1}$ respectivamente. A partir da equação de Arrhenius mostrou-se que a energia de ativação para a reação com a enzima oriunda das plantas crescidas em pH 3,5 foi maior que o controle, corroborando o aumento observado no K_M . Além disso, verificou-se inibição de até 5% da atividade da H⁺ATPase promovida por molibdênio (Yan et al., 1998).

2.5 H⁺ATPase de Tonoplasto

No tonoplasto (membrana do vacúolo de plantas) são reconhecidas duas proteínas transportadoras de H⁺ dependentes de ATP (V-H⁺ATPases) e de pirofosfato. (V-H⁺PPases) A catálise pelas diferentes bombas pode ser identificada através do perfil de inibição da H⁺-ATPase, que é sensível a nitrato e bafilomicina A₁ e concanamicina C (Maeshima, 2001).

Quanto à estrutura, as V-H⁺ATPases podem ser identificadas como complexos cujas subunidades são arranjadas em dois domínios: V₁, responsável pela hidrólise de ATP e V_o, um domínio integral à membrana que viabiliza a translocação de H⁺ entre dois compartimentos separados por uma membrana (Sze e Palmgren, 1999). No domínio V₁, podem ser identificadas oito subunidades distintas, com massa molecular de 7013 kDa, cuja estequiometria é A₃B₃CDEFG₂H₁₋₂ (Xu, Vasilyeva e Forgac, 1999). O domínio transmembrana (V_o – fração sensível à oligomicina) apresenta um complexo de cinco subunidades (260 kDa), responsáveis pelo transporte de H⁺ através da membrana.

As V-H⁺ATPases são estruturalmente relacionadas às F₁F_o-ATP sintases. Entretanto, as F-ATPases normalmente sintetizam ATP em mitocôndrias, cloroplastos e membrana plasmática de bactérias, enquanto as V-H⁺ATPases dirigem o transporte de prótons graças à hidrólise de ATP (Palmgren, 2001). Apesar disso, imagens de ambos os tipos de enzima reveladas por microscopia eletrônica apresentaram homologia entre as subunidades ligantes ao nucleotídeo (A e B) das V-H⁺ATPases e subunidades α e β das F-ATPases (Kawasaki-Nishi, Nishi e Forgac, 2003).

Os sítios de ligação aos nucleotídeos foram localizados nas subunidades A (70kDa) e B (60 kDa) (Sze e Palmgren, 1999). É interessante notar que a redução de um resíduo de cisteína é evitada na presença de ATP e conduz à inibição da atividade dessas enzimas. Apesar de o resíduo de cisteína não desempenhar um papel diretamente na catálise, pode haver formação reversível de pontes dissulfeto, regulando a acomodação do ATP no sítio catalítico. Mesmo com três sítios de catálise (A) em V-H⁺ATPases, a modificação de um único sítio é suficiente para inibir completamente a atividade enzimática (Xu, Vasilyeva e Forgac, 1999).

De acordo com o esquema cinético, todas as proteínas periféricas e a cabeça (juntamente com seis subunidades c) representam o rotor do complexo V-H⁺-ATPases. A hidrólise de ATP gera um torque estrutural na subunidade A, o que é convertido na rotação do anel inserido na membrana. Assim, prótons são vetorialmente translocados da porção citoplasmática para o compartimento vacuolar (Kluge et al., 2003). Esse conceito foi descrito como catálise rotatória e é fundamental para sustentar o transporte de H⁺ em direção aos compartimentos celulares extracitoplasmáticos (Noji et al., 1997 e 1999).

Um ponto interessante na regulação dessas enzimas foi observado na dissociação reversível da subunidade C, em resposta à depleção de glicose. Mutações em um número de resíduos aromáticos na subunidade C desestabilizaram o complexo V-ATPase, aumentando a taxa de atividade ATPásica e de transporte de H⁺ (Kawasaki-Nishi, Nishi e Forgac, 2003).

A subunidade E é termolábil e o aumento de seus transcritos tem sido observado em plantas expostas a pressões salinas (Golldack e Dietz, 2001). Já a subunidade B parece ser fundamental para a conexão entre os domínios V₁ e V_o. Dessa forma, o comportamento

tridimensional dessa estrutura pode manter a capacidade hidrolítica de ATP, independentemente do fluxo de H^+ (Xu, Vasilyeva e Forgac, 1999).

2.6 H^+ PPase de Tonoplasto

Existem duas formas diferentes de pirofosfatase inorgânica H^+ PPases que desempenham diferentes funções no metabolismo. Uma das formas é uma enzima citosólica, a outra é a forma associada à membrana, descrita em várias organelas (Grazinoli-Garrido, 2001). A pirofosfatase de membrana foi primeiramente descrita em mitocôndrias de *Rhodospirillum rubrum* e ocorrem em células de plantas, protozoários, algas e bactérias fotossintéticas, entretanto, não se observa esta enzima na membrana plasmática ou endomembranas de animais e leveduras (Maeshima, 2001).

Em plantas, a enzima é localizada na membrana do tonoplasto, V- H^+ PPase, funcionando como bomba de prótons acoplada à hidrólise de PPi. Recentemente, um novo tipo de H^+ PPase foi descrita fora da membrana do tonoplasto. A estequiometria H^+ /PPi foi determinada como 1 e o bombeamento de H^+ através da membrana do tonoplasto, a partir de um citoplasma neutro até o estado de equilíbrio, é capaz de alterar em até três unidades o pH (Maeshima, 2001). Esse gradiente eletrogênico atua na manutenção da homeostase de Ca^{+2} e Na^+ citosólica, além de permitir a estocagem de metabólitos orgânicos como ocorre pela ação das V- H^+ ATPases (Santos, A.C. et al., 2003).

A atividade das H^+ -pirofosfatases é estimulada por potássio e inibida por dicitohexilcarbodiimida (Maeshima et al., 1996). Ramos, Martins e Façanha (2005) verificaram estímulos na atividade específica de V- H^+ PPase de raízes de milho micorrizadas, especialmente por *G. clarum*. Esses resultados apontam, inclusive para o uso da atividade dessas enzimas como marcadores bioquímicos de processos de colonização micorrízica.

A concentração de PPi citosólica encontra-se em torno de $200\mu M$, o suficiente para promover a máxima atividade das V- H^+ PPase (Maeshima et al., 1996). De forma geral, os níveis de PPi celulares são regulados por diversas reações do metabolismo de ácidos nucleicos, aminoácidos, polissacarídeos e lipídeos (Grazinoli-Garrido e Sola-Penna, 2004). Santos, A. C. et al. (2003) mostraram uma surpreendente interação entre a atividade da V- H^+ PPase com a PFP (fosfofrutocinase dependente de pirofosfato). A PFP apresenta K_{eq} próxima de 1, o que permite a rápida reversão da reação por ela diretamente catalisada. Assim, na carência de PPi, essa enzima é capaz de regenerá-lo utilizando como substrato a Frutose-1-6-bisfosfato. Com isso, o acoplamento dessas reações mantém o gradiente transmembranar de H^+ .

Diferentemente do complexo F-ATPases, as V-ATPases são simples enzimas de transdução de energia. Essa bomba de prótons consiste em um simples polipeptídeo (Maeshima, 2001). A V- H^+ PPase de plantas apresenta de 761 a 771 resíduos de aminoácidos com massa de 80 a 81 kDa e tamanho aparente em dodecilsulfato de sódio (SDS) de 70 a 73 kDa. Essas enzimas mostram seqüências de aminoácidos bastante conservadas, especialmente as regiões CS1, CS2 e CS3, onde alcançam até 91% de identidade entre plantas. Com isso, V- H^+ PPases são consideradas enzimas-chave no entendimento da origem e evolução do vacúolo central em plantas (Maeshima, 2001)

Na região CS1, voltada para o citosol, encontra-se o domínio DV-GADLVGKVE, onde resíduos ácidos são cruciais para a hidrólise do PPi e o bombeamento do H^+ . Está presente também nessa região o sítio de ligação de K^+ e Mg^{2+} . O centro catalítico das V- H^+ PPase de feijão apresenta os domínios DDPK, VGDN e GDTIGD, nos quais resíduos de ácido aspártico se mostram essenciais para a catálise. As bombas de prótons dirigidas por PPi do tonoplasto apresentam ainda alguns domínios comuns às P-ATPases (Maeshima, 2001).

De forma geral, as duas bombas de prótons: V- H^+ ATPase e V- H^+ PPase, juntamente com as aquaporinas são as três proteínas mais abundantes do tonoplasto (Maeshima, 2001). Uma vez que o vacúolo realiza importante papel na homeostasia da planta, encerrando

substâncias essenciais para o vegetal, o conhecimento da fisiologia dessas bombas se torna flagrante.

2.7 Assimilação de Amônio em Plantas

A assimilação de N ocorre apenas na forma amoniacal. Quando a fonte nutricional de nitrogênio é o NO_3^- , a planta necessita de duas reações adicionais, promovidas pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, onde são utilizados oito moles de elétrons (na forma de equivalentes reduzidos como NADPH e Ferredoxina) para a produção de um mol de amônio. Portanto, o íon amônio pode ser a fonte preferencial de nitrogênio para várias espécies, em função do alto custo energético da assimilação de N de fontes nítricas (Kronzucker et al., 1999).

Duas vias são reconhecidamente responsáveis pela assimilação de amônio: aquela onde a única enzima responsável é a glutamato desidrogenase (GDH-EC.1.4.1.1) e a via onde se observa o funcionamento conjunto da glutamina sintetase (GS-EC. 6.3.1.2) e a glutamato oxoglutarato amôniotransferase (GOGAT-EC.1.4.1.3) também chamada de glutamato sintase.

A via da GDH foi a primeiramente descrita e tida como única via de assimilação do NH_4^+ até 1970, quando a GOGAT foi descoberta em plantas (Lea e Mifflin, 2003). A GDH promove diretamente a aminação redutiva do 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato), com a oxidação de um NADH ou NADPH, formando o aminoácido glutamato. Esta reação é reversível e apresenta alto K_M para o amônio. Dessa forma, atualmente reconhece-se essa via como atuante em condições especiais como altas concentrações de NH_4^+ , no metabolismo de senescência e, principalmente, na regulação da relação C/N da célula, através da reciclagem do α -cetoglutarato (Lancien, Gadal e Hodges, 2000 e Dubois et al., 2003).

Quanto à localização, a GDH está presente nas raízes e parte aérea, sendo observada nas mitocôndrias, onde a coenzima utilizada seria NADH, no cloroplasto, onde depende de NADPH, e no citoplasma, mais recentemente identificada. Não havendo sobreposição da atividade de GDH em dois compartimentos celulares diferentes (Dubois et al., 2003). Pode-se estabelecer que, em condições normais, esta enzima seria importante na reciclagem de altos níveis de amônio liberados na fotorrespiração, em reações catabólicas e no metabolismo ligado à senescência (Souza, Stark e Fernandes, 2002).

Quanto a estrutura, a enzima GDH apresenta duas subunidades (α e β). A subunidade α seria induzida por altas concentrações de amônio, o que sem dúvida aumenta a atividade aminativa (Dubois et al., 2003). Essa atividade seria limitada em condições de baixa luminosidade (Lancien, Gadal e Hodges, 2000). Enquanto isso, o crescimento sob níveis baixos de N estimula a desaminação do glutamato pela GDH, que também atua como via catabólica na germinação, na senescência e em condições onde o α -cetoglutarato é utilizado para reestruturar o Ciclo de Krebs, funcionando como uma via anaplerótica (Lancien, Gadal e Hodges, 2000 e Dubois et al., 2003).

Já a via das enzimas GS e GOGAT, seria a responsável pela assimilação primária de amônio em plantas superiores. Nessa via, o amônio é inicialmente incorporado na posição γ do glutamato pela ação da GS. Assim é formada a glutamina, com o gasto de um ATP. Posteriormente, por ação da GOGAT, o grupamento amida é transferido, de modo redutivo, para a posição alfa do α -cetoglutarato. São formados dois glutamatos e é oxidado um equivalente redutor. Um dos glutamatos produzidos ciclicamente é reutilizado em nova reação da GS.

Atualmente, são reconhecidas três isoformas de GS: GS1, citosólica; GS2 cloroplástica e GSr também citosólica mas, típica de raízes. De acordo com a proporção das isoenzimas GS1 e GS2 classificam-se quatro categorias de plantas, sendo o arroz enquadrado no grupo C, onde GS2 apresenta mais do que 70% da atividade total. Esta enzima apresenta atividade tanto na forma octamérica quanto tetramérica e sofrem forte influência de fatores ambientais, como os níveis de luz (Souza, Stark e Fernandes, 2002).

A energia necessária para a catálise pela GS citosólica (GS1 e GSr) é proveniente do ATP fosforilado em nível de substrato, produzido na via glicolítica e do ATP produzido na fosforilação oxidativa mitocondrial. O ATP utilizado para a reação da GS2 é produzido fotossinteticamente.

Em trabalho recente, utilizando-se da construção de plantas de milho mutantes com expressão aumentada ou diminuída dos genes *gln1-1* a *gln 1-5* e do gene *gln2*, respectivamente das isoformas de GS1 e GS2, Martin et al. (2006) puderam caracterizar a fisiologia e localização das diferentes isoformas: o gene *gln1-1* foi localizado no córtex radicular, codificando a GSr, com função principal na síntese de glutamina para o crescimento vegetativo; o gene *gln 1-2* foi localizado no floema, sendo ainda duvidosa a função da GS codificada por ele, que poderia atuar no transporte de glutamina; o gene *gln 1-3* e *gln 1-4* teriam especial importância na produção de grãos, sendo encontrados nas células do mesófilo foliar e nas células companheiras e atuando no aumento do número e do tamanho da espiga; o gene *gln 1-5*, encontrado na epiderme foliar, não apresentou uma função definida; já o *gln 2*, plastidial, estaria presente em folhas jovens, atuando na reassimilação de amônio e na síntese de glutamina para o crescimento vegetativo.

A enzima GOGAT está presente em plantas superiores de duas formas: a primeira seria aquela que utiliza como equivalente redutor o NADH (NADH-GOGAT) e a outra, aquela na qual os elétrons utilizados em sua reação de redução provêm da Ferredoxina reduzida (Fd-GOGAT). Uma forma dependente de NADPH já foi detectada. A NADH-GOGAT é típica de tecidos não verdes como raízes, cotilédones em desenvolvimento e nódulos ativos, enquanto a Fd-GOGAT pode alcançar até 1% da proteína total das folhas (Lea e Miflin, 2003).

O poder redutor oriundo da Fd é proveniente das reduções ocorridas nas reações luminosas da fotossíntese. Contudo, quando a Fd-GOGAT encontra-se ativa em tecidos não fotossintetizantes, o seu poder redutor passa a ser proveniente dos equivalentes reduzidos nas reações de oxidação de açúcares (NADH e NADPH), a mesma fonte do poder redutor para a reação da NADH-GOGAT (Souza, Stark e Fernandes, 2002).

Os níveis de luz mostram uma relação de ativação e indução da Fd-GOGAT. No escuro, os baixos níveis de Fd-GOGAT *GLU1* RNAm podem ser parcialmente repostos por sacarose, porém, não se reestabelecem os níveis de RNAm para *GLU2*. As concentrações de nitrato, amônia e amônio parecem guardar relação direta com a atividade dessa enzima e induzir sua transcrição. A regulação da atividade e da transcrição da NADH-GOGAT guarda uma relação muito mais estreita com o incremento nas concentrações de NH_4^+ , após aplicação de 1mmol/L desse íon em plântulas crescidas em meio sem amônio, elevou em dez vezes a atividade da enzima. Mesmo em concentrações tão pequenas quanto 50 $\mu\text{mol/L}$, após 12 horas observou-se um incremento nos níveis de RNAm pra NADH-GOGAT (Lea e Miflin, 2003).

O produto final de assimilação do amônio pelas vias descritas (glutamato e glutamina) pode, por meio das enzimas asparagina sintetase (AS-EC.6.3.5.4) e aspartato aminotransferase (AspAT-EC.2.6.1.1), dar origem aos aminoácidos aspartato e asparagina. A AS pode ainda produzir asparagina diretamente da assimilação de NH_4^+ no aspartato. Como o K_M da AS é bastante elevado para NH_4^+ , esta enzima só efetuará esta reação em níveis tóxicos para a planta, de essencial importância em virtude da alta relação C:N (4:2) do aminoácido formado.

2.8 A Glicólise

A glicólise (via glicolítica) foi a primeira via metabólica a ser esclarecida e, provavelmente até hoje, é a melhor entendida do ponto de vista conceitual e regulatório. A via glicolítica inclui uma seqüência de reações enzimáticas, que converte a molécula de glicose em duas moléculas de piruvato com concomitante utilização de duas moléculas de ATP e

posterior produção de quatro destas moléculas, apresentando assim um saldo de duas moléculas de ATP.

Em células capazes de continuar o processo mitocondrial de oxidação da glicose até CO_2 e H_2O , a glicólise é o ponto de partida do ciclo do ácido cítrico e da cadeia respiratória. Já em casos em que a célula não possua a maquinaria necessária para essa completa oxidação da glicose, como no caso dos eritrócitos, ou onde o meio não esteja oferecendo condições para que isso ocorra, por exemplo, em casos de anaerobiose, o piruvato procedente da glicólise pode ser transformado em lactato, acetato ou etanol, dependendo do organismo. A diferença na utilização da molécula do piruvato é a mais significativa modificação da glicólise entre os diferentes organismos.

A degradação da glicose ocorre em duas fases. A primeira consiste em uma série de cinco reações enzimáticas, que é responsável pela fosforilação da glicose e a sua transformação em duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. Nesta fase são consumidas as duas moléculas de ATP. Na segunda fase ocorrem mais cinco reações, que consistem na transformação das duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato formadas anteriormente, em duas moléculas de piruvato, nessa fase são produzidas quatro moléculas de ATP. Ao final da glicólise, há um saldo total de duas moléculas de ATP produzidas por molécula de glicose metabolizada. Em vegetais, a presença da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase permite o salto do estágio de 1,3 bisfosfoglicerato, produzindo diretamente 3-fosfoglicerato. Esse passo leva à produção de 1 NADPH ao invés da redução de 1 NAD e a fosforilação de 1 ATP.

Em plantas, especialmente em tecidos fotossintetizantes, as reações ocorridas entre a formação dos intermediários 3-fosfoglicerato e gliceraldeído 3-fosfato são comuns ao Ciclo de Calvin-Benson. Assim, fazem parte do processo de fotossíntese. Da mesma forma, como o ATP também é produzido na fotossíntese, nos tecidos verdes, a reversão da glicólise passa a ter importância como fonte de açúcares para outros órgãos.

Fica claro que a glicólise vegetal pode ocorrer no citossol como no plastídeo. E que seus substratos são originados da quebra da sacarose e do amido, respectivamente. Além disso, vários intermediários de três ou seis carbonos como a dihidroxi-acetona fosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato (PEP) e piruvato são intercambiáveis entre esses compartimentos celulares.

Juntamente com o ATP, os produtos da glicólise são o NADH e o piruvato. A formação desses produtos depende das condições de outras fases celulares. Em plantas, o piruvato pode surgir no citossol oriundo de uma prévia desfosforilação do PEP que deixara a via glicolítica em direção ao vacúolo. O piruvato pode ter vários destinos, dependendo em parte da disponibilidade de oxigênio. Em condições favoráveis, o piruvato é descarboxilado oxidativamente e ligado a coenzima A. Ele entra no ciclo do ácido cítrico, onde é oxidado, formando gás carbônico com produção adicional de NADH, FADH_2 e ATP ou GTP. Nestas condições, o NADH produzido na glicólise e no ciclo do ácido cítrico é reoxidado a NAD^+ durante a cadeia respiratória.

A velocidade com que a glicose é consumida é muitas vezes maior em condições anaeróbicas do que em condições aeróbicas. Contudo, a formação de ATP a partir da glicólise em condições anaeróbicas (duas moléculas de ATP por molécula de glicose) é bem menor do que a quantidade formada a partir da oxidação completa da glicose a gás carbônico em condições mitocondriais aeróbicas, onde são formadas 30 ou 32 moléculas de ATP por molécula de glicose.

A velocidade da glicólise é regulada principalmente pelo nível do ATP, visto que é importante para a célula manter uma concentração constante desta molécula, não importando qual o substrato utilizado para produzi-la. Quando se apresenta em níveis muito elevados, diminui a velocidade da via glicolítica. O ajuste exigido na velocidade da glicólise é alcançado pela regulação de duas enzimas glicolíticas chave: a fosfofrutocinase-1 (PFK) e a piruvatocinase (PK). Ambas as enzimas são reguladas alostericamente. Em tecidos

fotossintetizantes de plantas a regulação se dá de baixo para cima, a partir da piruvato cinase, enquanto em animais, a regulação é feita principalmente a partir da PFK. Essa enzima passa a ter importância na regulação glicolítica de plantas em tecidos onde a glicólise é importante via de degradação de açúcares para a produção de energia e esqueletos carbônicos, com na raiz.

A fosfofrutocinase (EC.2.7.1.11) (PFK) é uma sofisticada enzima alostérica que catalisa a conversão de frutose-6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato na presença de MgATP. Essa reação ocorre com a transferência do fosfato γ terminal do MgATP para o carbono 1 da frutose-6-fosfato. A estrutura quaternária da fosfofrutocinase pode ser encontrada em diversas formas, dentre as quais são mais comuns as diméricas e tetraméricas. As formas diméricas e tetraméricas estão sempre em equilíbrio.

Em vegetais e bactérias, outra enzima, conhecida como PFK dependente de PPI: frutose-6-fosfato 1-fosfotransferase (PFP-EC.2.7.1.90), pode catalisar a reação descrita para a PFK. Esta enzima apresenta duas subunidades (α de 66KDa e β de 60KDa) com 60% de homologia entre elas (Podestá e Plaxton, 2003). A PFP utiliza como doador de grupos fosforilas o pirofosfato inorgânico (PPI). O PPI tem um papel fundamental nos processos bioenergéticos, sendo produzida ao longo de várias reações biossintéticas, tais como a síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. A molécula de PPI tem um papel regulatório no controle de certos processos fisiológicos e uma produção exagerada torna seus níveis citossólicos tão elevados que podem vir a ser prejudiciais à célula. (Grazinoli-Garrido e Sola-Penna, 2004).

A fosfofrutocinase tem sido largamente estudada, devido às suas características alostéricas; por sua capacidade de ser regulada por vários moduladores e devido a sua característica de ser a enzima chave da glicólise. Sua atividade, na maioria dos organismos, é sensível a uma série de sinais regulatórios que são os responsáveis pelo seu reconhecimento como um passo fundamental no controle da glicólise. Um dos mais potentes reguladores desta enzima é o ATP, o qual em altas concentrações inibe a atividade da PFK, pois diminui sua afinidade para um dos seus substratos, a frutose-6-fosfato. Esse efeito alostérico é atribuído à ligação do ATP a um sítio específico e regulatório distinto do sítio catalítico (Passonneau e Lowry, 1962).

A PFK não é inibida somente por altas concentrações de ATP, mas também por citrato, um intermediário do ciclo do ácido cítrico. O citrato aumenta o efeito inibitório do ATP. Desse modo, ao se elevarem simultaneamente as concentrações de ATP e citrato, ocorre um combinado efeito de inibição alostérica (Roberts e Kellert, 1980). Esta inibição é revertida por AMP e por esta razão a atividade da enzima aumenta com a diminuição da relação ATP/AMP (Smolen, 1995). Portanto, a velocidade da glicólise depende da necessidade de ATP, a qual é sinalizada pela relação ATP/AMP e pelo nível do citrato. (Passonneau e Lowry, 1962; Parmeggiani e Bowman, 1963).

Em algas verdes, a atividade da PFK também é regulada positivamente por baixos níveis de fosfoenolpiruvato (PEP), o que leva ao incremento do fluxo glicolítico (Turpin et al, 1990). No entanto, os níveis de PEP são mantidos baixos pela atividade da PK que é regulada negativamente por glutamato, além de sofrer ativação pelos níveis de gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato. Sendo assim, altos níveis de glutamato proporcionariam uma regulação negativa por feedback no fluxo glicolítico (Turpin et al, 1990).

Há algumas décadas, reconhece-se que íons amônio atuam como potentes estimuladores da PFK de diversos tecidos de vertebrados e invertebrados e em leveduras (Abrahams e Younathan, 1970 e Sugden e Newsholme, 1975). Na presença de 2mM de NH_4^+ a fosfofrutocinase de músculo de coelho apresenta decaimento do K_m para ATP e para frutose 6-fosfato, além de aumento no K_i para citrato (Abrahams e Younathan, 1970). Enquanto na presença concomitante de Pi, 0,1 mM de amônio já mostra atividade estimulante em PFK de músculo de nematóides, maior do que aquela observada para K^+ e Rb^+ (Sugden e Newsholme, 1975). Além do amônio, outros compostos com grupos amônio quaternários

apresentam alta especificidade por um sítio da enzima atuando na manutenção da sua forma tetramérica mais ativa (Abrahams e Younathan, 1971).

Em 1980, foi descoberto um novo regulador da glicólise, a frutose 2,6-bisfosfato. A frutose 2,6-bisfosfato é um produto do metabolismo que atua como ativador da fosfofrutocinase em animais, entretanto, não mostra atividade em plantas superiores (Pilkis et al; 1981 e Uyeda, Furuya e Luby, 1981 e Podestá e Plaxton, 2003). Frutose 2,6-bisfosfato age sinergicamente com AMP para diminuir a inibição promovida pelo ATP (Uyeda, Furuya e Luby, 1981). Apesar da frutose 2,6-bisfosfato não apresentar atividade modulatória em plantas vasculares, esse açúcar mostra-se um ativador alostérico, sob concentrações nanomolares, da atividade da PFP (PPi-PFK). Trabalhos com fluorescência intrínseca e cinética mostraram que a frutose 1,6-bisfosfato também é capaz de ativar esta enzima competindo pelo sítio de ligação da frutose 2,6-bisfosfato. Esta enzima sofre inibição por fosfato inorgânico (Pi) (Podestá e Plaxton, 2003).

A PFP apresenta menos que 35% de homologia estrutural com a PFK. Contudo, o sítio de ligação do doador de fosforilas mostra 71% de similaridade entre resíduos de aminoácidos. Isto poderia explicar a capacidade desta enzima ligar, além do PPi, o ATP em *E. histolytica* e certamente em todos os seres vivos (Chi e Kemp, 2000). Esta enzima parece funcionar como um regulador dos níveis internos de ATP, uma vez que se mostra mais eficiente em estados de hipóxia quando a glicólise é a única via produtora de ATP (Roscher et al., 1998).

Como anteriormente dito, para que a assimilação do amônio ocorra de forma perfeita, o metabolismo de N deve interagir com o metabolismo de C, uma vez que são necessários poder redutor na forma de Fd reduzida ou NAD(P)H; ATP e esqueletos carbônicos (Turpin et al, 1990 e Lancien, Gadal e Hodges, 2000). Em tecidos não fotossintetizantes como nas raízes, essas moléculas energéticas são oriundas especialmente da glicólise.

Além disso, a assimilação de NH_4^+ causa rápido incremento na respiração para a oferta de esqueletos carbônicos para a síntese de aminoácidos (Turpin et al, 1990). Como a glicólise, além de fornecer poder redutor e ATP, também fornece esqueletos carbônicos para a biossíntese de aminoácidos, esta via se torna crucial nos estudos das relações entre metabolismo de carbono e nitrogênio, sendo suas principais enzimas reguladas pelos níveis destes compostos.

Um perfeito fluxo glicolítico é essencial para a manutenção do aporte de Acetil-CoA, além de produzir PEP que ao ser carboxilado dá origem ao oxaloacetato para o Ciclo do ácido cítrico. Esse ciclo é o principal fornecedor de esqueleto carbônico na forma de α -cetoglutarato para a assimilação de nitrogênio, e conseqüente produção de aminoácidos e enriquecimento protéico da planta (Lancien, Gadal e Hodges, 2000). O α -cetoglutarato parece ser a interface entre o metabolismo de C e N, seus níveis celulares em plantas é comparativamente baixos sendo sua produção preponderantemente oriunda da respiração de açúcares (Lancien, Gadal e Hodge, 2000). Essa integração foi observada em tomates que receberam suplementação de α -cetoglutarato (Magalhães, Huber e Tsai, 1992). Essas plantas, muito sensíveis a altos níveis de amônio, apresentaram um incremento nos teores de aminoácidos em raízes e parte aérea com concomitante decréscimo nos teores de amônio livre.

O incremento na atividade da glicólise pode ser vislumbrado através da elevação em até 40% na respiração, com concomitante declínio de crescimento, quando administradas elevadas concentrações de NH_4^+ para cevada. Isto se deveria ao esforço energético para a manutenção do potencial de membrana para um ciclo fútil de influxo e perdas de nitrogênio em plantas não suscetíveis à nutrição amoniacal, o que não se observa em arroz, uma planta excepcionalmente tolerante. Esse resultado corrobora o descrédito atual da hipótese de que a toxidez pelo NH_4^+ se deveria ao desacoplamento da fotofosforilação nos cloroplastos (Britto et al., 2001b). Nesse caso, a via glicolítica seria essencial no provimento energético e sua perfeita regulação poderia ser responsável pela tolerância à nutrição amoniacal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha de Variedades

Foram utilizadas duas variedades de arroz, sendo a variedade Piauí, adaptada às condições ambientais do Trópico Úmido e a variedade melhorada IAC-47.

Todas as sementes das variedades foram fornecidas pela EMBRAPA Arroz e Feijão mediante contrato firmado anteriormente.

3.2 Tratamento Estatístico dos Dados

O delineamento experimental foi um fatorial de dois tratamentos e duas variedades, com três repetições de potes em blocos com cinco plantas por pote, a partir dos quais foi colhido material para as purificações de enzimas e constituintes celulares. A purificação da PFK foi feita a partir de um grande bloco de dez potes, totalizando cinquenta plantas. Após a purificação das enzimas, os ensaios foram sempre feitos com ao menos três repetições analíticas das reações, de acordo com a peculiaridade de cada reação. Para o processamento dos dados obtidos foi utilizado o software Sigma Plot™ para a análise de variância e teste de médias. Foram consideradas diferenças significativas aquelas que apresentaram no teste de T $p < 0,05$.

3.3 Germinação e Plantio das Sementes

As sementes de arroz foram previamente selecionadas, guardando a mesma relação de tamanho e sendo desprezadas aquelas que apresentarem macroscopicamente sinais de patologias ou infestação por microorganismos. Foram desinfectadas com hipoclorito de sódio a 2% por 30 min em agitação e, posteriormente, lavadas abundantemente com água destilada. A seguir foram colocadas sobre papel de filtro umedecido em placas de Petri que sofreram desinfecção com álcool 70%, em temperatura ambiente e luz plena.

3.4 Cultivo das Plantas de Arroz

As plântulas de arroz foram cultivadas em câmara de crescimento, a 24°C e 12h de luz.dia⁻¹ (200 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em potes de 400 mL, com solução de Hoagland e Arnon (1950) a ½ força iônica durante 5 dias após a germinação (DAG) e, a seguir, a força iônica total até 26 DAG. Durante todo o período as plântulas foram cultivadas sob duas diferentes doses de N-NH₄⁺: 0,1 mM e 1,0 mM (Figura 1). A renovação da solução foi feita a cada três dias, e o pH foi corrigido diariamente para pH 5,5 com NaOH. O cultivo foi diferenciado no ensaio cinético de amônio.

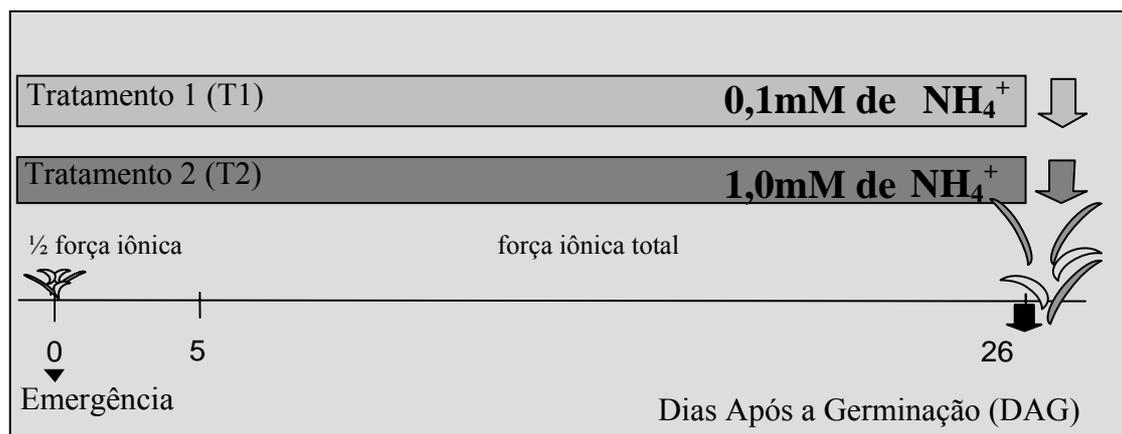


Figura 1: Esquema do sistema experimental onde plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 foram cultivadas com 0,1 ou 1,0 mM de N-NH_4^+ até 26 DAG (dias após a germinação).

3.5 Ensaio Cinético de Absorção de NH_4^+

Para o ensaio de cinética de absorção de NH_4^+ um grupo de plantas recebeu aos 24 DAG nova solução nutritiva isenta de amônio. Posteriormente, aos 26 DAG, as soluções com os tratamentos 0,1 e 1,0 mmol/L de NH_4^+ , pH 5,5 retornaram. Durante um período de 72 horas, a variação do pH foi acompanhada e amostras de solução nutritiva foram retiradas a cada 60 min, com a finalidade de se construir as curvas de depleção do íon amônio no período. O NH_4^+ foi dosado colorimetricamente de acordo Mitchell (1972).

3.6 Purificação da P-H^+ ATPase, V-H^+ ATPase e V-H^+ PPase

Para o ensaio das P-H^+ ATPases, V-H^+ ATPases e V-H^+ PPases, foi feita a extração da fração microsossomal, composta por vesículas de tonoplasto e de plasmalema, por fracionamento celular, segundo método descrito por Yoshida et al. (1983) com as adequações descritas por Rodrigues (2005) e por Ramos, Martins e Façanha (2005). Aproximadamente, 9 g de raízes foram secos e pesados após a lavagem com água deionizada. A massa de raízes foi acondicionada em almofariz mantido gelado. Foram adicionados 25 mL de tampão de extração pH 8,0, constituído de 10% glicerol; 50 mM 2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3 diol (TRIS)-HCl pH 8,0; 250 mM sacarose; 2 mM ácido etilenoglicol tetracético (EGTA) pH 7,5; 2 mM Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) pH 7,5; 150 mM KCl; 100 mM cloreto de colina; 1% Polivinilpirrolidons (PVP) 40T; 0,5% albumina; 5 mM ditiotretol (DTT); 2 mM β -mercaptoetanol; 1 mM Plimetilssufonil fluoreto (PMSF) onde às raízes foram esmagadas. O extrato foi filtrado em quatro camadas de gaze. O filtrado foi centrifugado a 3600 x g, durante 10min, a 4°C. O sobrenadante foi vertido em novo tubo de centrifuga e submetido a 10000 x g por 10 min, a 4°C. Novamente, o sobrenadante foi transferido para novo tubo e centrifugado a 105000 x g por 45 min, a 4°C. O material depositado foi ressuspensão com a adição de 1,5 mL de tampão de ressuspensão pH 7,5 (30 mM TRIS-HCl, pH 7,5; glicerol 15%; 1 mM EGTA, pH 7,5; 1 mM EDTA, pH 7,5; 2 mM MgCl_2 ; 2mM DTT; 1 mM PMSF). No purificado das frações microsossomais obtido foi dosada a proteína total pelo método de Bradford (1976). O mesmo foi estocado em alíquotas de 0,5 mL, após rápido congelamento em N_2 líquido, a -20°C.

3.7 Atividade da P-H⁺ATPase

A atividade da P-H⁺ATPase foi determinada colorimetricamente pela liberação de Pi (Fiske e Subbarow, 1925). A reação ocorreu em meio com 0,5 M ácido 3-(N-Morpholino)propanosulfônico (MOPS) - 1,3-bis[tris(hidroximetil)etil-amino]propano (BTP), pH 6,5; KCl 1 M; 0,1 M MgSO₄; 40 mM ATP-BTP; 0,1 M Na₂MoO₄; 1% Brij 58; 200 nM Bafilomicina; 0,1M NaN₃; 40 µg.mL⁻¹ proteína. A atividade foi medida na presença e na ausência de ortovanadato de sódio 10 mM, um inibidor da H⁺-ATPase da plasmalema (Serrano, 1988). Após 45 min de reação a 30°C, foi adicionado ao meio 1 mL de meio de parada gelado (2% H₂SO₄; 3% SDS; 0,7% (NH₄)MoO₄). Imediatamente, os tubos foram levados ao gelo e adicional 50 µL de ácido ascórbico (10%). Após 10 min, foram adicionados 1,45 mL de meio para evitar coloração adicional (4% citrato de sódio; 2% ácido acético glacial). O conteúdo de Pi liberado na hidrólise de ATP foi determinado em leitura espectrofotométrica a 820 nm (Fiske e Subbarow, 1925). Sempre foram feitos tubos brancos na ausência de Bafilomicina; vanadato; ATP-BTP e proteína.

3.8 Atividade da V-H⁺ATPase

A atividade da V-H⁺ATPase foi determinada colorimetricamente pela liberação de Pi (Fiske e Subbarow, 1925). A reação ocorreu em meio com 0,5 M ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico (HEPES)-BTP, pH 7,5; KCl 1 M; MgSO₄ 0,1 M; ATP-BTP 40mM, pH 7,5; 0,1 M Na₂MoO₄; 1% Brij 58; 10mM ortovanadato de sódio; 0,1 M NaN₃; proteína 40 µg.mL⁻¹. A atividade foi medida na presença e na ausência de 1 M KNO₃, um inibidor da H⁺-ATPase do tonoplasto (Serrano, 1988). Após 45 min de reação a 30°C, foi adicionado ao meio 1 mL de meio de parada gelado (2% H₂SO₄; 3% SDS. 0,7% (NH₄)MoO₄). Imediatamente, os tubos foram levados ao gelo e adicional 50 µL de ácido ascórbico (10%). Após 10 min, foram adicionados 1,45 mL de meio para evitar coloração adicional (4% citrato de sódio; 2% ácido acético glacial). O conteúdo de Pi liberado na hidrólise de ATP foi determinado em leitura espectrofotométrica a 820 nm (Fiske e Subbarow, 1925). Sempre foram feitos tubos brancos na ausência de KNO₃; vanadato; ATP-BTP e proteína.

3.9 Atividade da V-H⁺PPase

A atividade da V-H⁺APPase foi determinada colorimetricamente pela liberação de Pi (Fiske e Subbarow, 1925). A reação ocorreu em meio com 0,5M MOPS-Imidazol, pH 7,2; MgSO₄ 0,1M; Pirofosfato de sódio 0,1 M; 1% Brij 58; 0,1 M NaN₃; proteína 40 µg. mL⁻¹. A atividade foi medida na presença e na ausência de 100mM KCl, um ativador específico da H⁺-PPase do tonoplasto e na presença de 2,5mM NaF, ativador de outras Pirofosfatases. Após 45 min de reação a 30°C, foi adicionado ao meio 1 mL de meio de parada gelado (2% H₂SO₄; 3% SDS. 0,7% (NH₄)MoO₄). Imediatamente, os tubos foram levados ao gelo e adicional 50 µL de ácido ascórbico (10%). Após 10 min foram adicionados 1,45 mL de meio para evitar coloração adicional (4% citrato de sódio; 2% ácido acético glacial). O conteúdo de Pi liberado na hidrólise de PPi foi determinado em leitura espectrofotométrica a 820 nm (Fiske e Subbarow, 1925). Sempre foram feitos tubos brancos na ausência de NaF, KCl; Pirofosfato de sódio e proteína.

3.10 Purificação da Glutamina Sintetase (GS), Glutamato Sintase (GOGAT) e Glutamato Desidrogenase

A purificação das enzimas de assimilação do amônio foi feita a partir de 1 g do terço médio da parte aérea e raízes das duas variedades de arroz. O material foi cortado em pedaços menores, diretamente no almofariz resfriado e coberto com N₂ líquido para esmagamento total com auxílio de pistilo durante 1min. Após o esmagamento, foram acrescentados 4mL de

tampão de extração com imidazol-HCl 0,5 M pH 5,0. A mistura foi filtrada em quatro camadas de gaze e papel de filtro. O extrato foi recolhido em tubos de ensaio no banho de gelo. Alíquotas de 1,5 mL do extrato foram colocadas em tubos para centrifuga refrigerada e realizada a centrifugação por 15min, à temperatura de 0°C e 15000 x g. O sobrenadante (extrato) foi recolhido e utilizado nos ensaios enzimáticos.

3.11 Atividade da Glutamina Sintetase (GS)

Foram encubados 0,3 mL do extrato obtido na purificação com 0,5 mL do coquetel de incubação (0,2 mL de tampão imidazol-HCl 0,5 M pH 5,0; 0,1 mL de β -mercaptoetanol; 0,1 mL de $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,4 M; 0,1 mL de hidroxilamina; 0,1mL de ATP; 0,1mL de glutamato e 1,0mL de H_2O). Foram feitos controles sem o acréscimo de ATP. O meio de incubação permaneceu em banho-maria a 30°C, por 30min. No final do período, as amostras foram retiradas, foram acrescentados 1,5 mL de solução de cloreto férrico para interromper a reação. A mistura foi filtrada e a produção de γ -glutamil monohidroxamato, após a complexação do hidroxamato com $FeCl_3$, foi lida em espectrofotômetro em 540 nm (Bergersen, 1980).

3.12 Atividade da Glutamato Sintase (GOGAT)

Para determinação da atividade da GOGAT, foi incubado 0,1 mL do extrato com 0,15 mL de TRIS-HCl 1M pH 7,8; 0,2 mL de glutamina 75 mM; 0,2 mL de α -cetoglutarato e a reação teve início pelo acréscimo de NADH. A leitura da absorbância ocorreu imediatamente em 340 nm e após 15 min foi verificada a redução na absorbância pela oxidação do NADH de cada amostra. O controle foi feito sem Na- α -cetoglutarato (Bergersen, 1980).

3.13 Atividade da Glutamato Desidrogenase em sua Função Aminativa (GDH)

Em tubo de ensaio foi acrescentado 0,3 mL do tampão de incubação TRIS-HCl 1M pH 8,0; 0,1 mL de Na- α -cetoglutarato 0,33 M; 0,1 mL NH_4Cl 3 M; 0,1 mL do extrato vegetal; 2,1mL de água destilada. A mistura permaneceu em banho-maria a 35°C. Foi lida a absorbância em 340 nm no momento em que 0,3 mL de NADH 1 mM foi acrescentado, 10 min após foi verificada a redução na absorbância pela oxidação do NADH de cada amostra. O controle foi feito sem Na- α -cetoglutarato (Bergersen, 1980).

3.14 Atividade da Glutamato Desidrogenase em sua Função de Desaminação (GDH-desaminação)

Em tubo de ensaio foi acrescentado 0,3 mL do tampão de incubação TRIS-HCl 1M pH 9,4; 0,25 mL de glutamato 0,6M; 0,3 mL $CaCl_2$ 10mM; 0,1mL do extrato vegetal; 1,75 mL de água destilada. A mistura permaneceu em banho-maria a 30°C. Foi lida a absorbância em 340 nm no momento em que 0,3mL de NAD^+ 1mM foi acrescentado, 10 min após foi verificada o aumento na absorbância pela redução NAD^+ de cada amostra. O controle foi feito sem glutamato (Bergersen, 1980).

3.15 Maceração das Amostras para Extração Alcoólica e Partição com clorofórmio para a Determinação dos Teores de N-amino livre, NH_4^+ e Açúcares Solúveis

Foi utilizado 1,0 g de parte aérea e 1,0 g de raízes de cada amostra colhida aos 26 DAG para maceração em 20 mL de etanol 80% e a seguir sofreu partição com clorofórmio. A fração obtida foi utilizada para as determinações de N-amino (Yemm e Cocking, 1955), NH_4^+ (Mitchell, 1972) e Açúcares Solúveis (Yemm e Willis, 1954).

3.16 Determinação de N-total por Digestão Sulfúrica, Arraste a Vapor e Titulação

Amostras de parte aérea e raiz coletadas aos 26 DAG foram secas em estufa de ventilação forçada à temperatura de 60°C por três dias. O material desidratado foi moído e 0,2 g levado à digestão com H₂O₂ e H₂SO₄. O extrato obtido foi destilado por arraste a vapor, onde se determinou o N-total por meio de titulação conforme descrito por Tedesco (1983).

3.17 Purificação da Fosfofrutocinase (PFK) e Frutose 6-p 1-fosfotransferase (PFP)

Amostra com cerca de 1 g do terço médio do tecido radicular foi cortada em pedaços menores e levada diretamente no almofariz resfriado. Cuidadosamente, o material foi homogeneizada com 2,5 mL de tampão Tris 50 mM (pH 6,8) contendo MgCl₂ 5 mM, mercaptoetanol 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Glicerol 15% (v/v), PMSF 1,0 mM. O extrato foi centrifugado a 40000 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante, extrato bruto, foi utilizado para a dosagem das enzimas PFK e PFP (Biemelt et al., 1999).

3.18 Atividade da Fosfofrutocinase (PFK) e Frutose 6-p 1-fosfotransferase (PFP) pelo Método Calorimétrico (Método Acoplado)

A atividade da PFP foi feita diretamente com o extrato bruto em meio contendo 50mmol/L Tris-HCl (pH 7,4), onde foi adicionado 5 mmol/L de MgCl₂, 1mmol/L de Frutose-6-p, 1,0 μmol/L de Frutose-2,6-bp, 0,5 mmol/L NaPPI, 5 mmol/L NADH, 1,5 unid. de aldolase, 2,5 unid. de triose-p isomerase e 4 unid. de α-glicerofosfato desidrogenase. A reação foi mantida a 24^oC por 5min. e a leitura da absorbância ocorreu em 340 nm (Sola-Penna et al., 2002 adaptado).

Para a atividade da PFK foi utilizado o extrato bruto em meio contendo 50 mmol/L Tris-HCl (pH 7,4), onde foi adicionado 5 mmol/L de MgCl₂, 1mmol/L de Frutose-6-p, 0,1mmol/L ATP, 5mmol/L NADH, 1,5 unid. de aldolase, 2,5 unid. de triose-p isomerase e 4 unid. de α-glicerofosfato desidrogenase. A reação foi mantida a 24^oC por 5min. e a leitura da absorbância ocorreu em 340 nm (Sola-Penna et al., 2002). Nestes experimentos não foram adicionados ao meio de reação 5mmol/L (NH₄)₂SO₄, conforme descrito no protocolo original, para evitar a camuflagem dos efeitos fisiológicos o amônio sobre a enzima.

3.19 Medição do Comprimento da Raiz Seminal

No momento da coleta, após lavagem e secagem da raiz, esta foi estendida sobre papel absorvente e a maior raiz (raiz seminal) foi medida com régua com aproximação de milímetros.

3.20 Determinação das Concentrações dos Pigmentos Fotossintetizantes

Aos 26 DAG 0,1 g de tecido foliar foi coletado macerado em frasco âmbar contendo 5 mL de acetona pura gelada. Os frascos foram estocados a 4°C durante três dias. Posteriormente, o extrato cetônico foi filtrado e sua absorbância lida em 661,6 nm, 644,8 nm e 470 nm, respectivamente para clorofila a, clorofila b e carotenóides (Majerowicz et al., 2002). Os cálculos de concentração dos pigmentos foram realizados de acordo com o descrito por Lichtenthaler (1987) como se seguem:

$$\text{Clorofila a } (\alpha) = [(11,24 Y) - (2,04 Z)] 50$$

$$\text{Clorofila b } (\beta) = [(20,13 Z) - (4,19 Y)] 50$$

$$\text{Clorofila a + b } (\gamma) = [(7,05 Y) + (18,09 Z)] 50$$

$$\text{Carotenóides} = [(50000 \theta):214] - [(1,9 \alpha):214] - [(63,14 \beta):214]$$

Onde:

Y - absorbância a 661,6 nm Z - absorbância a 644,8 nm θ - absorbância a 470 nm

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Absorção de Amônio em Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47

A análise da tabela 1 permitiu observar que após o processo de purificação da fração microssomal do tecido radicular, como descrito em Material e Métodos, os teores de proteína encontrados diferiram significativamente entre as variedades no tratamento com 0,1 mM de N-NH_4^+ . A variedade Piauí apresentou concentração maior de proteínas na fração microssomal nesse tratamento em relação à variedade IAC-47. Resultado semelhante foi observado por Rodrigues (2005) ao tratar plantas de arroz das mesmas variedades com pulsos de NO_3^- e purificar diferencialmente as vesículas de tonoplasto e plasmalema. Apesar de estar claro que os dados de concentração de proteínas microssomais não dizem respeito exclusivamente às bombas de prótons, pode-se inferir sobre a adaptação morfo-fisiológica das plantas Piauí às baixas concentrações de nutrientes.

Dessa forma, as plantas Piauí apresentariam constitutivamente maiores concentrações de proteínas de membrana, ou maior quantidade de membranas, em resposta à deficiência de nitrogênio. Esta hipótese está de acordo com as características de adaptação às condições do Trópico Úmido, em contraposição à variedade melhorada IAC-47, a qual foi selecionada sob elevadas pressões de altas doses de N, como observado por Ferraz Jr. et al. (2001).

Tabela 1: Concentração de Proteína Purificada na Fração Microssomal de Raiz ($\mu\text{g. g}^{-1}$ MF) de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva a 0,1 e 1,0 mM de N-NH_4^+ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores referentes à média de 3 repetições analíticas de material purificado de 3 blocos de 3 potes com 5 plantas cada.

Variedade / Tratamento	Proteína Purificada na Fração Microssomal de Raiz
	$\mu\text{g. g}^{-1}$ MF
Piauí 0,1 mM N-NH_4^+	1230,54 \pm 38,08
Piauí 1,0 mM N-NH_4^+	1308,67 \pm 63,88
IAC-47 0,1 mM N-NH_4^+	544,38 \pm 113,84
IAC-47 1,0 mM N-NH_4^+	901,61 \pm 159,72

O ensaio da atividade de hidrólise de ATP e PPi na fração microssomal permitiu diferenciar as diversas bombas, a partir do uso de inibidores, pH e substrato específicos. A hidrólise de ATP através das $\text{P-H}^+\text{ATPases}$ mostrou-se significativamente maior nas plantas IAC-47, em ambos os tratamentos, sem diferença estatística significativa dentro da mesma variedade (Figura 2 A). Segundo Howitt e Udvardi (2000), evidências mostraram que a redução do pH não altera significativamente a absorção do amônio pelos AMT1 , revelando a independência de co-transporte NH_4^+/H^+ . No entanto, nesta mesma revisão, ficou claro que o transporte dessa forma nitrogenada através de um uniporte é mantido por um $\Delta\Psi$ e, em menor grau, por um ΔpH mantidos graças a atividade de bombas de prótons de membrana.

Assim, as diferenças na atividade das $\text{P-H}^+\text{ATPases}$ (Figura 2 A), permitiriam um melhor desempenho das plantas IAC-47 na absorção da fonte nitrogenada. Esta também seria uma característica constitutiva dessa planta, que apresentaria elevada atividade de absorção de nitrogênio (Ferraz Jr. et al., 2001). Deve-se notar que a maior atividade nessas bombas também foi essencial para as plantas IAC-47 apresentarem capacidade de absorção de nitrato, onde há co-transporte com o H^+ (Rodrigues, 2005).

Quando se avaliou a atividade das H^+ -ATPases vacuolares observou-se um perfil inverso àquele apresentado para as bombas de plasmalema (Figura 2 B). Apesar de não ter sido encontrada diferença significativa entre os tratamentos dentro das variedades, foi nítida a maior atividade nas plantas da variedade Piauí. Rodrigues (2005) observou que a atividade de $V-H^+$ ATPases foi mais elevada na variedade Piauí do que na IAC-47 apenas quando as plantas receberam pulso de nitrato. Assim, fica claro que há um predomínio de características varietais, independente do tratamento na atividade de hidrólise de ATP por V e $P-H^+$ ATPases (Figura 2 A e B). Há predominância da atividade de H^+ -ATPases de plasmalema em plantas IAC-47, enquanto, nas plantas Piauí, o predomínio de hidrólise de ATP encontra-se na dependência da atividade de H^+ -ATPases do tonoplasto.

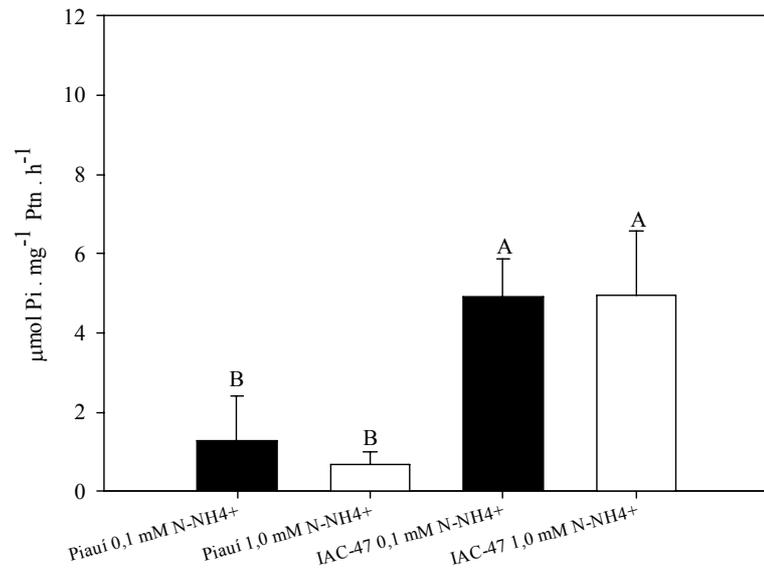
Contrariamente ao que ocorre para o nitrato, o estoque vacuolar de amônio seria mais transitório e dificultado pelo pH ácido (Howitt e Udivar, 2000). Dessa forma, a atividade exacerbada de $V-H^+$ ATPases encontrada para as plantas Piauí dificultaria o trânsito do amônio através do tonoplasto, mantendo os níveis citossólicos para a pronta assimilação mesmo em baixas concentrações. Já as plantas IAC-47 melhoradas sob altas doses de N, seriam capazes de, quando necessário, segregar o amônio no tonoplasto. A elevada atividade das bombas de tonoplasto em Piauí poderia também compensar a menor atividade daquelas de plasmalema, alcalinizando o citoplasma e mantendo o $\Delta\Psi$ em relação ao apoplasma. Isso criaria condições de absorção do amônio em ambas as doses.

A atividade das $V-H^+$ PPases não se mostrou diferente entre as variedades, nem entre os tratamentos (Figura 3)

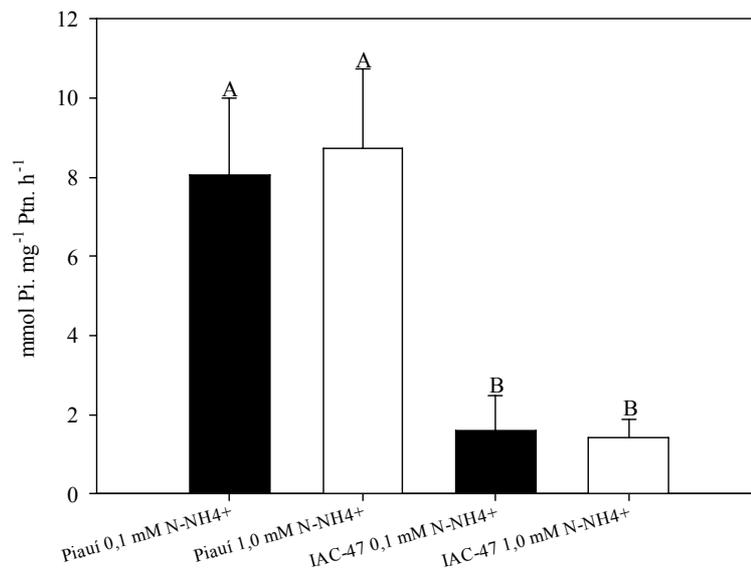
Essa baixa atividade, quando comparada às ATPases de vacúolo não surpreendeu. De forma geral, plantas lançam mão de bombas de H^+ , dirigidas pela hidrólise de pirofosfato em paralelo àquelas dirigidas por ATP. As $V-H^+$ PPases somente sobrepujariam a atividade das $V-H^+$ ATPases em casos extremos de estresse energético, onde o PPi atuaria como doador de energia para a célula (Santos et al., 2003 e Ramos, Martins e Façanha, 2005).

Quando se avaliaram as variações no pH da solução nutritiva a partir do 26º DAG pelas plantas (Figura 4 A), observou-se acidificação bem mais acentuada na concentração mais elevada de amônio (1,0 mM). A acidificação pode ser explicada pelo excesso de cátions absorvido pelas células radiculares, levando ao deslocamento de equivalentes de carga positiva para fora para evitar a hiperdespolarização da membrana com efeitos nocivos (Zonta et al, 2006). Esse efeito ocorre notoriamente na absorção de NH_4^+ e K^+ (Zonta et al, 2006) e é exacerbado na inexistência de simporte H^+/NO_3^- (Mendonça et al., 2005). Além disso, a variação do pH observada entre os dois tratamentos está de acordo com a manutenção do $\Delta\Psi$ e ΔpH necessárias para a absorção de NH_4^+ (Howitt e Udivardi, 2000).

As plantas da variedade Piauí tratadas com 1,0 mM de amônio produziram maior acidificação por pote entre a segunda e a décima hora (Figura 4 B). No entanto, como não houve uma normalização de massa ou área radicular, não foi possível caracterizar a maior capacidade de acidificação por estas plantas. Vale ressaltar que, em uma avaliação específica por miligrama de proteína purificada de raiz, as plantas IAC-47 apresentam maior atividade de bombas de prótons da plasmalema e, assim estequiometricamente teriam maior capacidade de acidificação do meio (Figura 2 A). Entretanto, no total da massa radicular, as plantas Piauí apresentaram maior quantidade de proteína, entre elas bombas eletrogênicas (Tabela 1).



A



B

Figura 2: Atividade de hidrólise de ATP ($\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \text{Ptn} \cdot \text{h}^{-1}$) por P-H⁺ATPase (**A**) e V-H⁺ATPase (**B**) da fração microsomal de tecido radicular de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de N-NH₄⁺ em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores referentes à média de 6 repetições analíticas de material purificado de 3 blocos de 3 potes com 5 plantas cada. (A, B) Diferença significativa para o Teste T ($p < 0,05$) entre variedades diversas no mesmo tratamento.

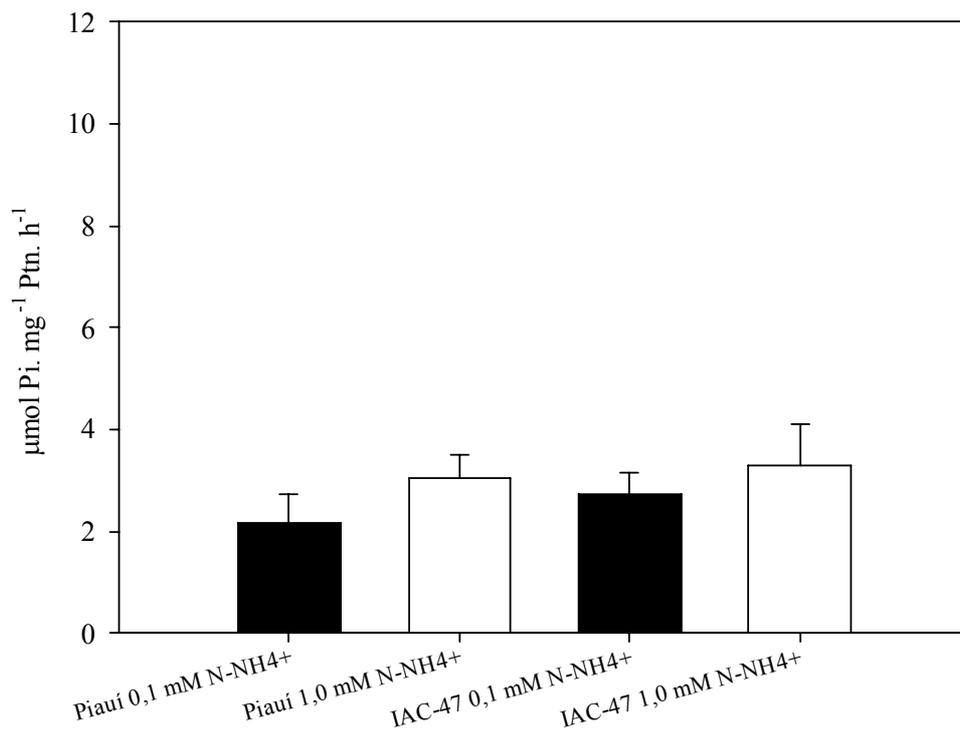
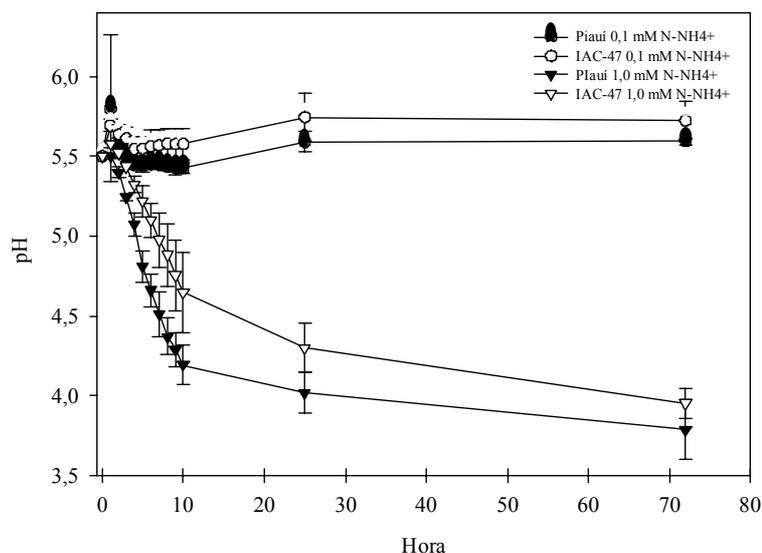
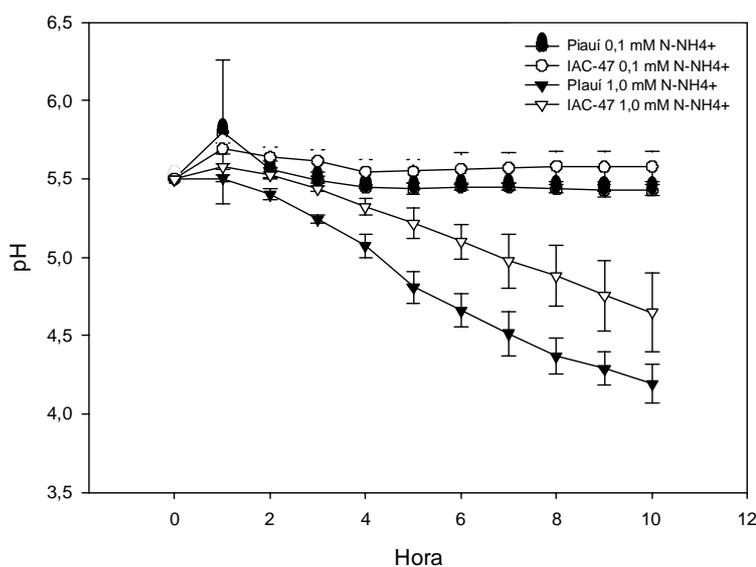


Figura 3: Atividade de hidrólise de PPI ($\mu\text{mol Pi. mg}^{-1} \text{ Ptn. h}^{-1}$) por V-H⁺PPase da fração microsomal de tecido radicular de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de N-NH₄⁺ em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Valores referentes à média de 6 repetições analíticas de material purificado de 3 blocos de 3 potes com 5 plantas cada.



A



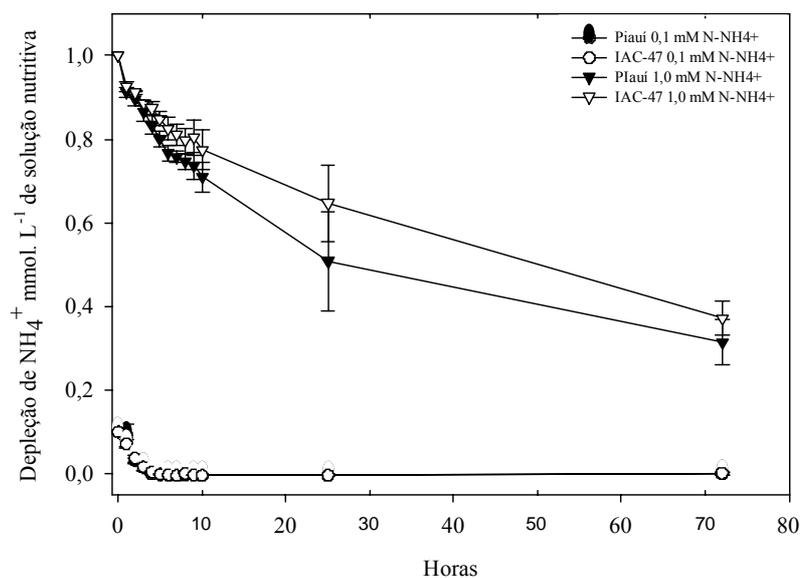
B

Figura 4: (A) Variação do pH na solução nutritiva a partir do 26º DAG pelas plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de N-NH_4^+ em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (B) Detalhe da 10 primeiras horas. Valores referentes à média de 5 potes de 5 plantas cada.

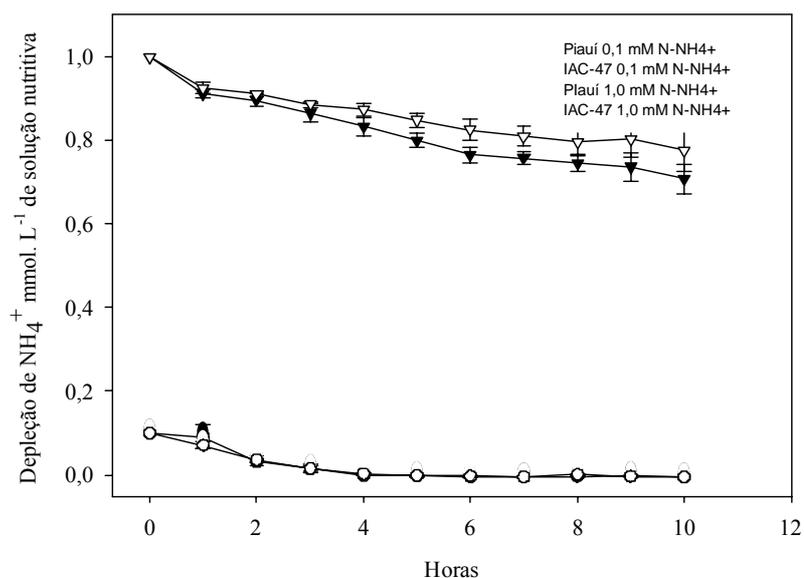
A depleção do amônio acompanhou a acidificação da solução nutritiva (Figuras 4 e 5). Não foi possível, entretanto, verificar a diferença varietal na acidificação. A mesma observação feita em relação ao pH, seria feita no tocante à capacidade de absorção por área radicular. Nesse caso, a capacidade de absorção de NH_4^+ pareceu estar relacionada às características constitutivas de cada variedade. A Piauí adaptada à baixa fertilidade de N do Trópico Úmido, empenhar-se-ia na produção de $\text{P-H}^+\text{ATPases}$, enquanto as IAC-47 apresentariam maior atividade específica dessas bombas para realizar a acidificação do meio externo. Assim, ficou nítida a necessidade do bombeamento de prótons para manter os $\Delta\Psi$ e ΔpH e permitir a absorção do NH_4^+ . Tal mecanismo é notório tanto para a faixa dos LATS, quanto para os HATS.

Deve-se notar que a depleção do amônio na solução com 0,1 mM ocorre com uma pequena acidificação inicial durante as quatro primeiras horas. Essa quase imperceptível acidificação é semelhante àquela observada para a solução 1,0 mM no mesmo período (Figura 4 B). Da mesma forma, a depleção do amônio é também semelhante, sendo absorvido da solução cerca de 0,1 mM da fonte no mesmo período. Após ter exaurido o amônio da solução menos concentrada, observou-se pequena alcalinização (Figura 4) certamente decorrente dos processos de absorção de outros nutrientes.

Ainda na figura 5B, observa-se que a depleção do amônio durante as quatro primeiras horas, até exaurir o amônio da solução 0,1 mM N-NH₄⁺, foi bastante semelhante para ambos os níveis nutricionais. Este fato poderia apontar para o fato de estarmos trabalhando com a mesma classe de transportadores. No entanto, mesmo após 72h, em ambas as variedades no tratamento com 1,0 mM, ainda se encontrava na solução nutritiva cerca de 0,4 mM de amônio. Dessa forma, fica claro que nos níveis nutricionais ensaiados teríamos transportadores com C_{mín.} diferentes, isto é, a concentração mínima onde se inicia a absorção de amônio diferentes.



A



B

Figura 5: (A) Depleção do NH_4^+ na solução nutritiva a partir do 26º DAG pelas plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de N-NH_4^+ em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. (B) Detalhe da 10 primeiras horas. Valores referentes à média de 5 potes de 5 plantas cada.

4.2 Desenvolvimento de Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47 em Resposta à Nutrição Amoniacal

Efeitos da deficiência de N podem ser vislumbrados a partir da análise do acúmulo de massa fresca e seca, da relação de desenvolvimento entre raiz e parte aérea e dos teores de N total, de frações solúveis e de pigmentos fotossintetizantes em várias plantas como o milho e o arroz (Santos, A.M. et al., 2003; Majerowicks et al., 2005). Alguns desses parâmetros tornam-se ainda mais representativos quando o estresse é causado pelo uso de amônio como fonte de N (Fernandes, 1990).

Há que se ressaltar que, para ambas as variedades, não foram observadas diferenças entre a massa fresca da parte aérea e da raiz no tratamento com 0,1 mM de N-NH₄⁺ (Tabela 2). Na verdade, o desenvolvimento no nível baixo de N foi bastante deficiente. As plantas de ambas as variedades crescidas a 0,1 mM de N-NH₄⁺ já começavam a apresentar sinais foliares de deficiência de N, como amarelecimento das folhas mais velhas e algumas folhas inferiores apresentavam coloração marrom-achocolatada. Tais sintomas apontariam para alterações metabólicas semelhantes àquelas encontradas na senescência por deficiência de N (Fageria; 1998a).

As plantas crescidas em níveis mais baixos de amônio apresentaram uma razão de desenvolvimento parte aérea e raiz bem próxima de 1 (Tabela 2). Semelhante resultado foi obtido por Baptista, Fernandes e Souza (2000), ao verificarem maior desenvolvimento radicular com concomitante elevação da capacidade de absorver NH₄⁺ na variedade Bico Ganga cultivada em baixas concentrações de nitrogênio. Contrariamente, nos tratamentos com 1,0 mM de N-NH₄⁺ a parte aérea desenvolveu-se mais em relação à raiz em ambas as variedades (Tabela 2). De toda forma, é reconhecido que o comprimento radicular guarda relação com o potencial de absorção de água e nutrientes (Zonta et al, 2006).

Tabela 2: Variação da Massa Fresca (g) na Parte Aérea e Raiz de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de NH₄⁺ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 μE m⁻² s⁻¹. Valores referentes à média de 3 blocos de 3 potes de 5 plantas cada.

Variedade / Tratamento	Massa Fresca (g)		Raiz/Parte aérea
	Raiz	Parte aérea	
Piauí 0,1 mM N-NH ₄ ⁺	7,85 ±0,49	7,98 ±0,32	0,98 ±0,06
Piauí 1,0 mM N-NH ₄ ⁺	7,46 ±1,78	12,88 ±2,21	0,56 ±0,08
IAC-47 0,1 mM N-NH ₄ ⁺	10,03 ±0,21	9,99 ±0,22	1,00 ±0,03
IAC-47 1,0 mM N-NH ₄ ⁺	12,36 ±1,69	18,86 ±2,59	0,66 ±0,01

Quando se comparou a massa fresca entre as variedades de um mesmo tratamento ficou nítido o maior desenvolvimento de raízes e parte aérea das plantas IAC-47 tanto em 0,1 quanto em 1,0 mM (Tabela 2). O desenvolvimento exacerbado da IAC-47 durante a fase vegetativa, em tratamentos de deficiência de N, podem trazer complicações em estádios posteriores do desenvolvimento, quando os constituintes celulares forem demandados por outros tecidos do vegetal.

Quando se compara as variações de massa fresca radicular entre tratamentos na mesma variedade, observa-se apenas um tênue aumento nas plantas IAC-47 tratadas a 1,0 mM. No entanto, o incremento de massas secas de parte aérea par entre tratamentos foi bastante significativo. Quando se eleva em 10 vezes a concentração de N-NH₄⁺, observa-se aumento de 61% na massa fresca de plantas Piauí e de até 89% nas plantas IAC-47.

Deve-se notar que o comprimento da raiz seminal das plantas Piauí no tratamento 1,0 mM de N-NH₄⁺ foi maior do que o medido nas plantas IAC-47 do mesmo tratamento (Figura 6). O comprimento da raiz sempre se mostrou menor nos tratamentos com 1,0 mM de N-NH₄⁺ quando comparado com o encontrado para plantas cultivadas a 0,1 mM (Figura 6). Estes dados puderam ser corroborados pela inspeção visual do dossel radicular dessas plantas (Figura 7 E e F). O desenvolvimento exacerbado das raízes foi observado para outras variedades de arroz em baixas concentrações de N e, principalmente, quando a fonte de N era o amônio (Baptista, Fernandes e Souza, 2000 e Mendonça et al., 2005).

De forma geral, o simples alongamento dos eixos principais das raízes não pode ser considerado como crescimento radicular, mas sim como alteração espacial do órgão (Zonta et

al, 2006). Isto porque, em certas condições limitantes, o crescimento radicular ocorre por intensa proliferação de eixos laterais (Zonta et al, 2006). Assim, a divergência entre comprimentos da raiz e massa fresca no tratamento 1,0 mM N-NH₄⁺ pode ser explicado pela arquitetura diferenciada das raízes das plantas IAC-47. Essas são bem mais finas e ricas em pêlos (Figura 7 G e H), o que favorece sobremaneira a absorção de nutrientes. Estes dados puderam ser corroborados pela inspeção visual do dossel radicular dessas plantas (Figura 7 G e H). Semelhante resultado foi encontrado por França, et al. (1990) quando compararam a área radicular das variedades IAC-4440 e Comum Branco. A variedade melhorada (IAC-4440) apresentou raízes mais finas e maior área específica. No entanto, a diferença radicular não foi refletida na acumulação de N, o que se deveria a um mecanismo compensatório de influxo radicular (França, et al., 1990).

Baptista, Fernandes e Souza (2000) mostraram que a variedade Bico Ganga, que a exemplo da Piauí está adaptada às condições impostas pelo Trópico Úmido, quando foi crescida em concentrações de nitrogênio amoniacal menores do que 4,3 mM, apresentou um maior desenvolvimento radicular com concomitante aumento na capacidade de absorver NH₄⁺. Contrariamente ao que foi observado para a variedade Agulha que apresentou menor desenvolvimento radicular e capacidade de absorver NH₄⁺ apenas em condições de alta concentração de nitrogênio.

Os efeitos do amônio no crescimento radicular podem ser vislumbrados a partir da relação deste íon com o metabolismo de carbono, posteriormente descrita. Pois, para o desenvolvimento da raiz, cerca de 44% do carbono fixado deve ser dirigido para este órgão (Zonta et al, 2006). Desse total 1/4 é utilizado na respiração celular e o restante para o crescimento dos tecidos (Zonta et al, 2006).

A variação de massa encontrada para a parte aérea das duas variedades em ambos os tratamentos (Tabela 2) pôde ser observada de forma tênue no dossel foliar das plantas aos 26 DAG, em potes escolhidos ao acaso (Figura 7). O maior desenvolvimento das plantas da variedade IAC-47 foi nítido para os dois tratamentos (Figura 7 C e D). No entanto, as diferenças se tornam mais nítidas entre tratamentos para cada variedade (Figura 7 A e B). Isto se deveria ao fato de além de outros componentes bioquímicos, haver uma maior porcentagem de água encontrada nas plantas tratadas com 1,0 mM de amônio em relação àquelas tratadas com extrema deficiência (0,1 mM) de amônio, o que levou a menor desenvolvimento dentro da mesma variedade (Tabela 2 e Figura 8).

Apesar da diferença entre tratamentos na mesma variedade, o perfil de massa fresca observado (Tabela 2) entre as variedades em ambos os tratamentos, manteve-se quando foi avaliada a massa das amostras secas (Figura 8). O resultado permitiu confirmar a hipótese de que apesar de maior acúmulo de água nas plantas tratadas com 1,0 mM de NH₄⁺, as diferenças entre variedades se mantiveram, não se devendo exclusivamente à maior hidratação dos tecidos, mas sim à produção de matéria orgânica e depósitos minerais.

Certo é que as variações morfológicas observadas nas plantas, como redução na massa seca, alteração no comprimento da raiz seminal e na relação raiz/parte aérea (Tabela 2 e Fig.6, 7 e 8) são resultantes de alterações metabólicas como descrito em outros trabalhos (Fageria, 1998a; Baptista, Fernandes e Souza, 2001; Hirel et al., 2005b). Por esse ponto de vista, a variedade IAC-47 poderia apresentar uma absorção otimizada do NH₄⁺, aproveitando-se inicialmente do saldo energético favorável. Entretanto, as plantas IAC-47 apresentariam menor deficiência na absorção de nitrato em relação à variedade adaptada às condições de Trópico Úmido, como observado por Ferraz Jr. et al. (2001).

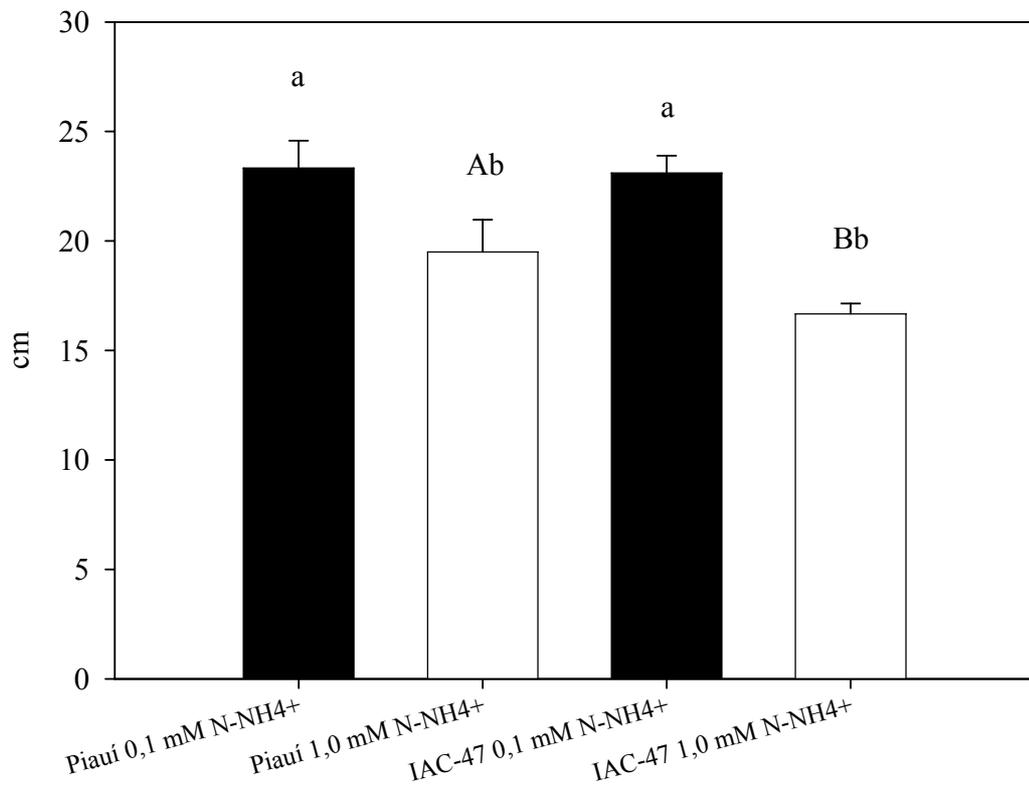


Figura 6: Comprimento da raiz seminal (cm) de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de NH₄⁺ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 μE m⁻² s⁻¹. Valores referentes à média de 3 blocos de três potes com 5 plantas cada. (a, b) Diferença significativa para o Teste T (p<0,05) entre tratamentos de uma mesma variedade. (A, B) Diferença significativa para o Teste T (p<0,05) entre variedades diversas no mesmo tratamento.

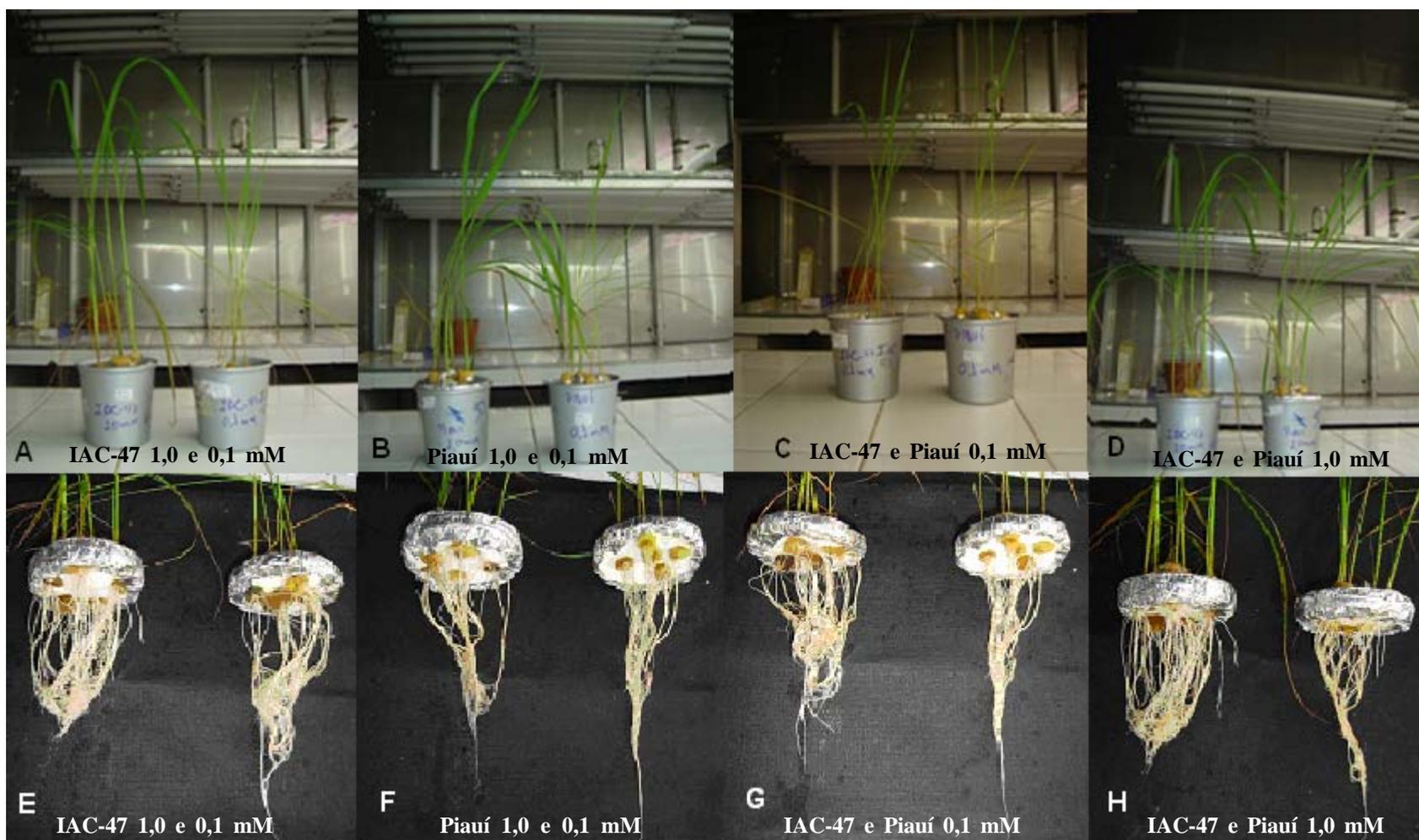


Figura 7: Análise visual do dossel foliar e radicular de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de N-NH_4^+ por 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. A e B; E e F: relação entre os tratamentos 1,0 e 0,1 mM de N-NH_4^+ nas variedades IAC-47 e Piauí, respectivamente. C e D; G e H: relação entre as variedades IAC-47 e Piauí nos tratamentos 0,1 e 1,0 mM de N-NH_4^+ , respectivamente.

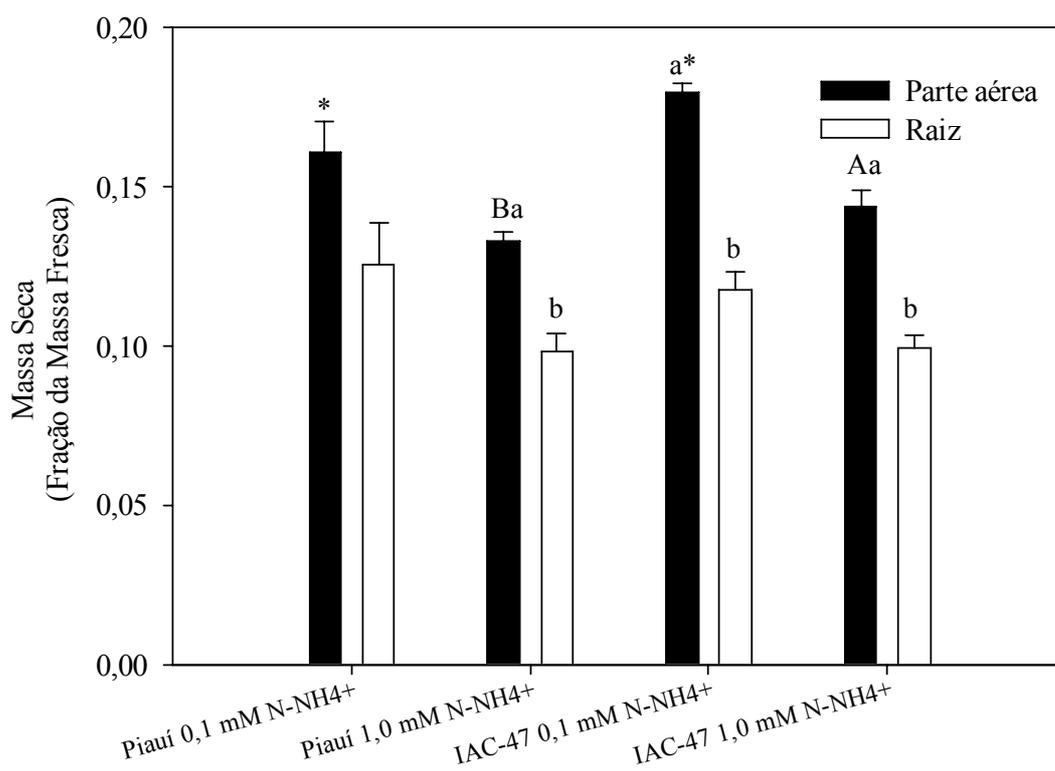


Figura 8: Massa Seca como fração da Massa Fresca na Parte Aérea e Raiz de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva com 0,1 e 1,0 mM de N-NH₄⁺ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores referentes à média de 3 blocos de 3 potes de 5 plantas cada. (a, b) Diferença significativa para o Teste T ($p < 0,05$) entre Raiz e Parte Aérea dentro de cada tratamento/variedade. (A, B) Diferença significativa para o Teste T ($p < 0,05$) entre variedades diversas no mesmo tratamento. *Diferença significativa para o Teste T ($p < 0,05$) entre tratamentos da mesma variedade.

4.3 Frações Solúveis, Pigmentos e Fluxo Glicolítico de Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47 cultivadas a 0,1 e 1,0 mM de N-Amônio

Para que se pudessem entender melhor as interações metabólicas provenientes da nutrição amoniacal foram analisados os conteúdos de frações solúveis, pigmentos fotossintetizantes e teor de N nas variedades Piauí e IAC-47. Além disso, a atividade da enzima fosfofrutocinase foi avaliada visando trazer subsídios para o entendimento da regulação do fluxo glicolítico nas condições estudadas.

Quando se avaliaram os teores totais de nitrogênio obtidos a partir da digestão do material seco, notou-se claramente maior acúmulo nas plantas crescidas em concentração de 1,0 mM de amônio em relação àquelas crescidas sob a menor concentração (Figura 9 A). Em ambas as variedades, o nível de N- NH₄⁺ fornecido às plantas refletiu-se diretamente no teor de N-total, tanto para a parte aérea quanto para a raiz. Entre as plantas crescidas a 0,1 mM de N-NH₄⁺ não se observou diferença varietal significativa, o que reafirma o achado de Fernandes (1990) quando utilizou as variedades Cana Roxa, naturalmente adaptada, e a IR-8, selecionada. No tratamento a 1,0 mM de amônio, a variedade Piauí apresentou teores mais elevados de N-total do que as plantas IAC-47 (Figura 9 A).

A Figura 9 B mostra que em todos os tratamentos e variedades houve maior acúmulo de N-amino livre na parte aérea quando comparada com a raiz. No caso da nutrição amoniacal, a raiz, além da absorção, atuaria também como importante órgão de assimilação.

Assim, é possível que o maior teor de N-amino na parte aérea (Figura 9 B) de todos os tratamentos seja resultado de um processo de senescência provocado pelas baixas doses de N e reduzida luminosidade (Silveira e Machado, 1990 e Buchaman-Wollaston, 1999), como proposto no capítulo anterior para as plantas crescidas nos níveis mais baixos de N.

Os teores de N-amino na parte aérea da variedade Piauí nunca se mostraram menores do que os encontrados nas plantas IAC-47 (Figura 9 B). Entretanto, esperava-se que plantas as IAC-47, que absorvem e assimilam N mais intensamente na fase vegetativa, redistribuíssem mais intensamente o N na senescência (Silveira e Machado, 1990). Porém, há que se destacar que as plantas Piauí são mais eficientes nas concentrações baixas de N e, assim o maior teor de N-amino encontrado, especialmente no tratamento em 1,0 mM, seja resultado dessa remobilização mais eficiente.

Ao se verificar os teores de açúcares solúveis, pôde-se explicar o acúmulo de N-amino na variedade Piauí. Tanto a parte aérea quanto a raiz desta variedade apresentaram menor acúmulo de açúcares solúveis comparado aos níveis encontrados nas plantas IAC-47 em ambos os tratamentos (Figura 9 C). Esse perfil foi ainda mais expressivo no tratamento com 1,0 mM de $N-NH_4^+$ (Figura 9 C). Os baixos teores de açúcares solúveis encontrados para plantas IAC-47 poderiam ser explicados pela menor eficiência de assimilação do N, em contrapartida à maior eficiência na absorção realizada por estas plantas (Ferraz Jr. et al., 2001).

A observação da queda nos níveis de açúcares em tratamentos com concentrações mais altas de amônio foi relatada por Fernandes (1990) como sendo a forma utilizada pelas plantas para a pronta assimilação do NH_4^+ . Os baixos teores de açúcares solúveis em plantas Piauí podem também apontar para estoque de carboidratos que podem ser mobilizados em estádios mais tardios do desenvolvimento, sendo importante, por exemplo, para a produção de proteína nos grãos.

Como as plantas Piauí estão adaptadas às condições de baixa fertilidade, tais plantas parecem lidar melhor com concentrações deficientes de amônio. Essas plantas apresentariam menor eficiência na assimilação de N à medida que as concentrações externas aumentam. Os resultados da figura 9 D mostram que plantas Piauí tratadas com 1,0 mM NH_4^+ mantiveram altos teores de amônio livre na parte aérea, apesar da importante assimilação refletida nos teores N-amino elevados e dreno de açúcares solúveis. Uma vez que, o movimento de amônio entre órgãos é bastante reduzido, é possível que, em virtude

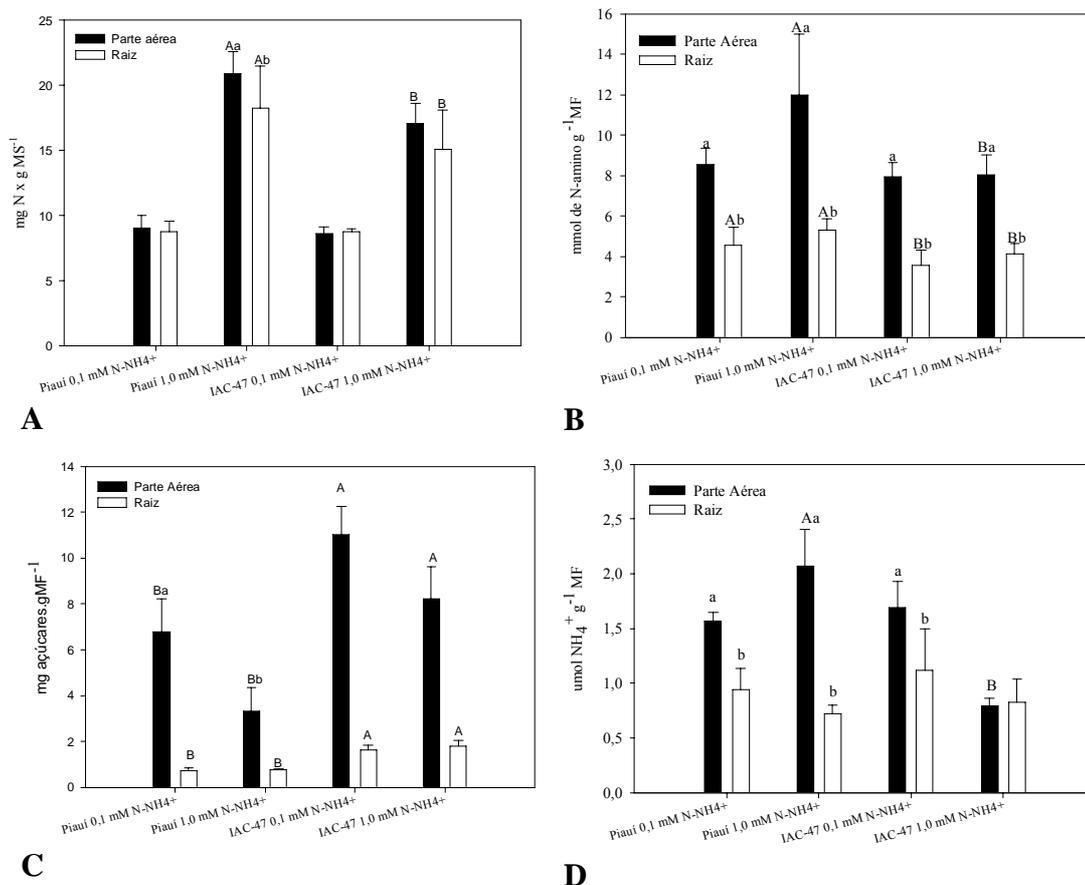


Figura 9: (A) Nitrogênio total em mg. g⁻¹ MS; (B) N-amino μmol g⁻¹ MF; (C) Açúcares solúveis em mg. g⁻¹ MF e (D) Amônio μmol. g⁻¹ MF na Parte Aérea e Raiz de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva a 0,1 e 1,0 mM de N-NH₄⁺ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 μE m⁻² s⁻¹. Valores referentes à média de 6 repetições analíticas de material purificado de 3 blocos de 3 potes com 5 plantas cada. (a, b) Diferença significativa para o Teste T (p<0,05) entre Raiz e Parte Aérea dentro de cada tratamento/variedade. (A, B) Diferença significativa para o Teste T (p<0,05) entre variedades diversas no mesmo tratamento.

Dos altos níveis de N-amino na parte aérea nessas mesmas condições, (Figura 9 B) haja estimulação das vias de desaminação, promovida principalmente por ação da GDH, liberando o amônio e mantendo concentrações equilibradas de α-cetoglutarato na parte aérea (Dubois et al., 2003), ou ainda, que o amônio seja proveniente da fotorrespiração.

Ainda com base nas características adaptativas, é possível entender a queda nos níveis de amônio livre no tratamento com 0,1 mM de amônio de plantas IAC-47. Essas plantas, selecionadas sob altas doses de N, apresentariam menor atividade de suas via de assimilação nas baixas concentrações de N.

A tabela 3 apresenta os teores de pigmentos fotossintetizantes obtidas das duas variedades e tratamentos. Esses pigmentos têm se mostrado poderosos marcadores para estimar a aquisição de N pelas plantas (Majerowicz et al., 2002). As plantas IAC-47 crescidas a 1,0 mM de amônio apresentaram maior concentração dos pigmentos do que aquelas crescidas a 0,1 mM, proveniente principalmente do incremento da clorofila b. Na verdade, as plantas IAC-47 crescidas a 0,1 mM também apontaram diferença varietal, apresentando

menor teor de clorofila total e de clorofila b em relação às plantas Piauí crescidas na mesma concentração. A redução nos níveis de clorofila é típico sintoma de senescência (Silveira e Machado, 1990 e Buchaman-Wollaston, 1999). Segundo Majerowicz et al. (2002), em milho, o teor dos pigmentos fotossintetizantes permitiu observar diferenças no estado nutricional das plantas, mas não diferenças varietais.

Tabela 3: Teores de Pigmentos Fotossintetizantes ($\mu\text{g. g}^{-1}$ MF) da Parte Aérea de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47, cultivadas em solução nutritiva a 0,1 e 1,0 mM de N-NH_4^+ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores referentes à média de 5 repetições analíticas de material purificado de 3 blocos de 3 potes com 5 plantas cada.

Variedade / Tratamento	Pigmentos Fotossintetizantes			
	$\mu\text{g. g}^{-1}$ MF			
	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila a+b	Carotenóides
Piauí 0,1 mM N-NH_4^+	860,4 \pm 11,7	833,0 \pm 108,0	1693,4 \pm 98,4	253,2 \pm 15,2
Piauí 1,0 mM N-NH_4^+	853,8 \pm 8,7	771,2 \pm 78,3	1625,0 \pm 80,9	258,3 \pm 12,1
IAC-47 0,1 mM N-NH_4^+	831,8 \pm 42,6	490,5 \pm 72,2	1322,3 \pm 34,4	263,0 \pm 5,4
IAC-47 1,0 mM N-NH_4^+	868,2 \pm 7,0	728,0 \pm 54,2	1596,2 \pm 58,1	256,5 \pm 6,9

Lima et al. (2004), ao trabalharem com as variedades de arroz BRS Bojurú e IAS 12-9 Formosa, resistentes ao estresse salino, encontraram teores de carotenóides, clorofilas a, b e total equivalentes aos níveis apontados na tabela 3. No entanto, não observaram diferença significativa entre as variedades. Isto somente foi encontrado ao compararem estas plantas com a variedade BRS Agrisul, mais sensível ao estresse salino, onde os teores de todas as clorofilas foram mais elevados.

Deve-se destacar que a clorofila b é um pigmento que não está diretamente ligado à transdução de energia para a fotossíntese, mas sim faz a ampliação da faixa de luz utilizada pela fotossíntese. Geralmente, a clorofila b responde por cerca de $\frac{1}{4}$ do total das clorofilas (Raven, Evert e Eichhorn, 2001). No entanto, Lima et al. (2004) verificaram que em arroz as proporções de clorofila b no total de clorofilas ultrapassam os 33%.

Nas plantas IAC-47 crescidas a 1,0 mM de NH_4^+ e em ambos os tratamentos das plantas Piauí, a proporção de clorofila b ultrapassou os 50% do somatório clorofila a+b. Parece que o incremento nessa clorofila acessória está relacionado aos baixos níveis de luz ($200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) utilizados na câmara de crescimento. Especialmente as plantas Piauí, que mostraram teores elevados de clorofila b como característica varietal, teriam a capacidade de melhor absorver luz em baixos níveis energéticos, como ocorre durante os meses de dezembro a julho quando a insolação é mais baixa nas localidades do Trópico Úmido, a que está adaptada (Rodrigues e Grazinoli-Garrido, 2005).

Torna-se importante observar que problemas no metabolismo de amônio podem advir de um aumento absoluto na disponibilidade do nutriente ou em virtude de uma carência de esqueletos carbônicos na forma de cetoácidos para a assimilação, provocando um aumento relativo de NH_4^+ (Souza e Fernandes, 2006). Assim, não basta às plantas apresentarem teores altos de açúcares para a perfeita assimilação do N, mas, sobretudo, é necessário apresentarem elevada atividade das vias bioquímicas que levam o açúcar a cetoácidos. Com isso, pode-se esperar alteração no fluxo glicolítico a fim de responder à demanda de energia e esqueletos

carbônicos para a assimilação e absorção do NH_4^+ , o que se refletiria no desenvolvimento estrutural da planta (Turpun et al, 1990; Howitt e Udvardi, 2000, Britto et al., 2001b, Stitt et al., 2002 e Santos A.C. et al., 2003).

O α -cetogluturato, principal esqueleto carbônico para a assimilação de nitrogênio (Lancien, Gadal e Hodges, 2000 e Stitt et al., 2002) é originado no Ciclo de Krebs que, por sua vez, é alimentado preponderantemente através dos produtos da glicólise ou da degradação de proteínas. A importância do α -cetogluturato na assimilação do amônio ficou evidente no trabalho de Magalhães, Huber, e Tsai (1992). Nesse trabalho foi observado um incremento no *pool* de aminoácidos em raízes e parte aérea, acompanhado de decréscimo nos níveis de amônio livre com a suplementação de α -cetogluturato. Assim, a glicólise é uma das vias cruciais aos estudos das relações entre metabolismo de carbono e nitrogênio.

Buscando avaliar essa interação, nesse trabalho foram dosadas as atividades das enzimas fosfofrutocinase (PFK) e frutose 6-p 1-fosfotransferase (PFP), responsáveis por um passo fundamental e altamente regulado da glicólise. A tabela 4 mostra a atividade da PFK em extrato de raízes nas diferentes variedades e tratamentos estudados. Houve incremento na velocidade de catálise nos tratamentos com 1,0 mM de amônio para ambas as variedades, proporcionalmente similares. Como a atividade da PFK pode ser considerada um retrato da capacidade glicolítica dessas plantas, a hipótese de aumento da glicólise na assimilação do amônio ficou comprovada.

Deve-se notar que as plantas da variedade Piauí apresentaram menor atividade de PFK apesar de seus açúcares solúveis estarem em níveis mais baixos (Figura 9 C). Assim, ao se estabelecer que a glicólise seria a principal via de intercâmbio entre a degradação dos açúcares e a biossíntese de aminoácidos, não pareceu ser esta degradação a responsável pelos baixos níveis de carboidratos nas plantas. As plantas Piauí poderiam apresentar constitutivamente atividade reduzida de sua maquinaria enzimática e menores teores de açúcares solúveis como já proposto. Fato semelhante já foi observado em outros experimentos, inclusive com nutrição nítrica quando a atividade de enzimas de assimilação de N sempre se mostraram reduzidas na variedade Piauí em comparação com plantas IAC-47 (Rodrigues, 2001).

As condições de baixo N e luminosidade favoreceram o acúmulo de N-amino (Figura 9 B) sem, no entanto, haver síntese protéica devido à carência energética. Esse quadro implica na reduzida produção de matéria seca, como observado por Fernandes (1991). Com isso, as plantas Piauí poderiam aumentar o estoque de substrato para a produção de proteína nos grãos (Ferraz Jr. et al, 2001). Uma grande saída para favorecer tal metabolismo é, sem dúvida, reduzir a degradação de açúcares na raiz (Tabela 4).

Outra explicação para a baixa atividade de PFK nos tratamentos com 0,1 mM de N-NH_4^+ em ambas as variedades poderia estar relacionada ao metabolismo de senescência (Buchanan-Wollaston, 1999). As plantas crescidas a 0,1 mM, que apresentaram características mais intensas de senescência em virtude das baixas doses de N, reduziriam os processos oxidativos de carboidratos (Tabela 4). Nessas condições, é possível haver um incremento na degradação protéica com uso da GDH, como via anaplerótica para manter os níveis mínimos de α -cetogluturato (Lancien, Gadal e Hodges, 2000 e Dubois, 2003). É discutível, ainda, que no metabolismo de senescência haja incremento da degradação de lipídios, inclusive com indução gênica, acompanhada da atividade do ciclo de glioxilato e reversão da glicólise para a gliconeogênese (Buchanan-Wollaston, 1999).

Tabela 4: Atividade da fosfofrutocinase (PFK) no extrato bruto de raízes (nmol frutose 1,6 bifosfato min⁻¹ mgPtn⁻¹) de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva a 0,1 e 1,0 mM de N-NH₄⁺ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e 200 μE m⁻² s⁻¹. Valores referentes à média de 3 repetições analíticas da amostra de extrato de um bloco com 10 potes com 5 plantas cada.

Variedade / tratamento	Atividade da fosfofrutocinase (nmol frutose 1,6 bifosfato min ⁻¹ mgPtn ⁻¹)
Piauí 0,1 mmol N-NH ₄ ⁺	0,5445 ± 0,002
Piauí 1,0 mmol N-NH ₄ ⁺	0,7830 ± 0,000
IAC-47 0,1 mmol N-NH ₄ ⁺	0,8575 ± 0,002
IAC-47 1,0 mmol N-NH ₄	1,0865 ± 0,087

É reconhecido que o próprio íon amônio atua como potente estimulador da PFK em diversos tecidos animais e em leveduras (Abrahams e Younathan, 1971 e Sugden e Newsholme, 1975). Apesar disso, não deveria ser esperado maior atividade da PFK em plantas Piauí, pois estas não apresentam teores elevados de amônio no material radicular utilizado para os ensaios. (Figura 9 D).

Uma regulação negativa por feedback possível da PFK seria promovida pelos altos níveis de glutamato, refletidos nos altos teores de N-amino (Figura 9 B), que inibiriam a enzima piruvato cinase que, por sua vez, reduziria o consumo de fosfoenolpiruvato (PEP). Os altos níveis de PEP levariam a uma inibição da PFK de baixo para cima, ao mesmo tempo em que ativa a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) a formar oxaloacetato que realimenta o Ciclo de Krebs, como observado em algas verdes (Turpim et al, 1990). Do ponto de vista fisiológico, esta regulação poderia permitir a manutenção de açúcares para a mobilização em momento específicos do metabolismo.

Quanto à PFP, as atividades encontradas em todos os tratamentos e variedades foram desprezíveis. É importante ressaltar que a PFP parece funcionar como um regulador dos níveis internos de ATP, uma vez que se mostra mais eficiente em estados de hipóxia quando a glicólise é a única via produtora de ATP (Roscher et al., 1998).

4.4. Regulação da Assimilação de Amônio em Plantas de Arroz das Variedades Piauí e IAC-47 e sua Integração como Metabolismo de C.

Segundo Hirel et al. (2005b), podem-se estabelecer três categorias de marcadores que ilustram diferentes aspectos dos teores de N em tecidos particulares ou na planta inteira de milho: 1) N-total, clorofila, proteína solúvel e atividade da GS; 2) N-amino; 3) Amônio e atividade da GDH. Em busca de marcadores que possibilitassem estabelecer alterações metabólicas ocorridas com as variações da nutrição amoniacal nas concentrações de 0,1 e 1,0 mM N-NH₄⁺ e sua integração com o metabolismo de C em plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47, foram ensaiadas as enzimas GS, GOGAT e GDH (aminação e desaminação), responsáveis pela assimilação do amônio.

Quando comparadas às plantas IAC-47, as plantas Piauí cultivadas no tratamento 1,0 mM N-NH₄⁺ mostraram uma maior atividade da enzima glutamato desidrogenase aminação (GDH) na parte aérea (Tabela 5). Isto apontaria para uma via preferencial para o consumo do amônio acumulado nessas plantas (Figura 9 D). Vale lembrar que plantas Piauí estão adaptadas às concentrações reduzidas de N, assim, ao absorverem o amônio, este seria concentrado no citossol para a pronta assimilação, o que pôde ser vislumbrado na comparação das atividades das ATPases de plasmalema e de tonoplasto (Figuras 2).

As plantas Piauí parecem resguardar seus açúcares para estádios posteriores do desenvolvimento, o que fica claro nos baixos teores de açúcares solúveis em parte aérea e raízes (Figura 9 C).

Apesar da maior atividade aminativa da GDH por grama de massa fresca na parte aérea de plantas Piauí a 1,0 mM N-NH₄⁺, a diferença entre variedades se perdeu ao analisarmos o tecido radicular (Tabela 5) e no nível mais baixo de nutrição (Tabela 5). Semelhante perfil foi observado para o amônio (Figura 9 D). Parece que, na extrema deficiência de N, como ocorrido na condição 0,1 mM N-NH₄⁺, a atividade da GDH estaria relacionada essencialmente ao metabolismo de reciclagem de N decorrente do catabolismo na senescência e na germinação (Lancien, Gadal e Hodges, 2000 e Dubois et al., 2003). De forma geral, a desaminação pela GDH foi bastante superior em raiz em relação à parte aérea de todos os tratamentos e variedades (Tabela 5). Certamente, isto guarda relação com o baixíssimo nível de açúcares solúveis (Figura 9 C) encontrado nas raízes, carecendo de esqueletos carbônicos para manter a função assimilatória do tecido radicular.

Especialmente as plantas IAC-47 mostraram a função desaminação da GDH na raiz maior no tratamento 0,1 em relação às plantas crescidas a 1,0 mM N-NH₄⁺ (Tabela 5). Isto se deveria às condições de altas concentrações de N utilizadas na seleção dessas plantas o que leva ao intenso catabolismo em situações de baixo N. Isto fica claro ao verificar-se a baixa atividade de degradação de açúcares na raiz (Tabela 4) no tratamento 0,1 mM N-NH₄⁺. Tais resultados reforçam a hipótese de degradação protéica com liberação de esqueletos carbônicos para alimentar o Ciclo de Krebs. O NH₄⁺ liberado seria incorporado pela atividade da GS, produzindo glutamina, o que reduz a relação C/N no *pool* de aminoácidos nessas plantas.

Deve ser ressaltado que a atividade aminativa de GDH apresentou-se sempre bastante elevada em relação à atividade de GS (GS1 + GS2) (Tabelas 5). Apesar dos resultados apontarem para a atividade de GS total, é descrito que a maior parte da atividade radicular se deve a isoforma GSr, enquanto nas folhas jovens a principal isoforma seria a plastidial (GS2) responsável pela síntese de glutamina para o crescimento vegetativo (Martín, et al., 2006).

Foi interessante notar que na parte aérea, a menor atividade da GDH aminação (IAC-47 1,0 mM N-NH₄⁺) foi acompanhada de altos valores de GS. A relação entre a atividade da GS e GDH-aminação comumente se mostraram contrárias, principalmente quando se compararam regiões em pleno crescimento com aquelas envelhecidas (Souza, Stark e Fernandes, 2002 e Stitt et al., 2002).

A atividade GS se elevou acompanhando a concentração de N no tratamento tanto na parte aérea, quanto na raiz (Tabelas 5). Como esta enzima integra a via responsável pela assimilação primária de amônio em plantas superiores (Souza, Stark, e Fernandes, 2002), seu incremento com o aporte de N não surpreendeu.

No entanto, na assimilação regular de N, a enzima GS participa de um ciclo de aminações com a enzima GOGAT formando glutamina com o uso de poder redutor na forma de Fd ou NAD(P)H; ATP e esqueletos carbônicos, na forma de α -cetogluturato (Lancien, Gadal e Hodges, 2000). Ao se analisar a atividade da GOGAT NADH dependente na parte aérea das plantas IAC-47 tratadas com 1,0 mM N-NH₄⁺, observou-se significativamente diferente daquela observada para plantas Piauí no mesmo tratamento (Tabela 5). O resultado, no entanto, não é repetido pela análise das raízes (Tabela 5). Porém, nas raízes tanto de Piauí, quanto de IAC-47, para ambas as concentrações de amônio, os valores de atividade de GOGAT são inversos aos de GDH, o que pode indicar a competição entre essas enzimas pelo substrato: α -cetogluturato.

Tabela 5: Atividade das enzimas glutamato desidrogenase ($\text{nmol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$); glutamina sintetase ($\text{nmol } \gamma\text{-glutamil min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$); glutamato sintase ($\text{nmol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$); glutamato desidrogenase-desaminação ($\text{nmol NAD}^+\text{cons. min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$) na Parte Aérea e Raiz de plantas de arroz das variedades Piauí e IAC-47 cultivadas em solução nutritiva a 0,1 e 1,0 mM de N-NH_4^+ durante 26 dias após a germinação em câmara de crescimento com 12 h/luz/dia e $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Valores referentes à média de 5 repetições analíticas de material purificado de 3 blocos de 3 potes com 5 plantas cada.

Variedade / tratamento	Atividade Enzimática			
	Glutamato Desidrogenase Aminoação ($\text{nmol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$)	Glutamina Sintetase ($\text{nmol } \gamma\text{-glutamil min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$)	Glutamato Sintase ($\text{nmol NADH min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$)	Glutamato Desidrogenase “desaminação” ($\text{nmol NAD}^+\text{cons. min}^{-1} \text{g}^{-1}\text{MF}$)
Parte Aérea				
Piauí 0,1 mmol N-NH_4^+	342,33 ± 153,43	36,90 ± 4,38	0,00 ± 0,00	1,66 ± 0,27
Piauí 1,0 mmol N-NH_4^+	462,78 ± 185,02	57,81 ± 13,61	7,14 ± 4,76	3,05 ± 0,39
IAC-47 0,1 mmol N-NH_4^+	416,07 ± 165,03	93,45 ± 23,09	0,00 ± 0,00	2,76 ± 0,25
IAC-47 1,0 mmol N-NH_4	136,88 ± 113,70	136,16 ± 30,40	29,13 ± 12,52	2,11 ± 0,04
Raiz				
Piauí 0,1 mmol N-NH_4^+	459,11 ± 206,16	29,40 ± 1,70	20,57 ± 4,67	19,61 ± 2,88
Piauí 1,0 mmol N-NH_4^+	499,24 ± 204,23	43,94 ± 14,87	25,37 ± 16,36	19,79 ± 1,71
IAC-47 0,1 mmol N-NH_4^+	537,85 ± 219,70	69,80 ± 29,19	15,94 ± 6,48	20,73 ± 2,73
IAC-47 1,0 mmol N-NH_4	403,34 ± 161,90	129,42 ± 3,36	24,31 ± 17,96	15,01 ± 0,99

Ao menos na parte aérea, ficou patente que a via preponderante no metabolismo de assimilação de amônio da variedade IAC-47 é aquela promovida pelas enzimas GS/GOGAT, enquanto a variedade Piauí se utilizou, ao menos nas condições de 1,0 mM de N-NH₄⁺, da via de assimilação promovida pela GDH, utilizando-se em menor grau a formação de amidas pela atividade da GS. O uso de caminhos metabólicos distintos entre as variedades pode ser explicado pelo o acúmulo de amônio na parte aérea (Figura 9 D) que ativa a GDH (Dubois et al., 2003) e pelos altos níveis de N-amino (Figura 9 B) que levam à inibição da GS (Souza, Stark, e Fernandes, 2002) em plantas Piauí.

Em raízes, órgãos que na nutrição amoniacal atuam fortemente como assimiladores, a escolha de vias diferentes entre as variedades é menos perceptível. É possível, no entanto, observar que, como já descrito, a atividade de GS em plantas Piauí é bastante reduzida.

A atividade exacerbada da GDH, acompanhada de baixa GS em plantas Piauí permitiria um acúmulo de glutamato. Sendo assim, a regulação negativa da PFK em raízes descrita por Turpin et al. (1990) poderia ocorrer. Segundo estes autores, essa interação levaria ao incremento nos níveis de fosfoenolpiruvato (PEP) por inibição da piruvato cinase pelo glutamato e retroinibição da PFK. O fluxo glicolítico somente seria restabelecido quando os níveis de Pi aumentassem ou pela desaminação do glutamato (Turpin et al., 2003). Este último parâmetro pode ser conseguido através de um ajuste fino promovido pela atividade desaminadora da GDH.

5 CONCLUSÃO

As plantas Piauí apresentaram uma integração entre o metabolismo de C e N que lhe conferiu melhor desempenho nas condições ambientais de baixas doses de N, especialmente 0,1 mM N-NH₄⁺, e reduzida luminosidade (200 μE m⁻² s⁻¹), como aquelas encontradas no Trópico Úmido. Enquanto isto, as plantas IAC-47 mostraram sintomas de senescência por deficiência nutricional nestas condições.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas Piauí apresentaram a capacidade de manter o perfil de acidificação da solução nutritiva e da absorção do amônio, através da maior concentração de bombas na fração microsomal, acompanhada de maior atividade específica de V-H⁺ATPases que favoreceram a concentração do amônio no citossol para sua rápida assimilação o que foi feito pela atividade de GDH. Essa característica seria essencial para a o sucesso em condições de deficiência de N. Por outro lado, as plantas IAC-47 absorvem o amônio devido à atividade específica das H⁺ATPases de membrana que mantêm concentrações de amônio citossólicas constantes que foram assimiladas pela via GS/GOGAT.

As deficiências de N induziram o crescimento das raízes das plantas Piauí, especialmente no tratamento 1,0 mM N-NH₄⁺, o que favoreceu sobremaneira a absorção de amônio. A dose de amônio refletiu-se proporcionalmente no acúmulo de massa fresca na parte aérea de ambas as variedades. Com isso, aumentou-se também a água retida nas plantas.

Em ambas as variedades, o N nutricional refletiu-se diretamente no acúmulo de N-total. As plantas Piauí apresentaram maiores teores de clorofilas (a+b) em relação às plantas IAC-47 no nível mais baixo de nutrição. Esta característica surge como uma adaptação essencial às condições de luz e nutrientes típicas do período de cultivo do arroz no Trópico Úmido, enquanto as plantas IAC-47 nessas condições apresentariam sintomas de senescência.

Além disso, as Piauí apresentaram maior acúmulo de N-amino e N-NH₄⁺ na parte aérea. Essas plantas parecem conviver bem com um *pool* maior de aminoácidos e amônio livre. Como a absorção do amônio foi proporcional entre as variedades, a existência de picos de amônio não corresponde a problemas na assimilação, pois também foi observada elevação na forma assimilada (N-amino). Assim, a queda nos açúcares solúveis estaria apontando para a manutenção da assimilação de N em plantas Piauí, enquanto nas IAC-47 poderia apontar para um sintoma da senescência por deficiência de N.

A disponibilidade de açúcares para a assimilação do amônio é feita através da maior atividade da PFK em raízes, nos níveis mais altos de nutrição. Na nutrição com 0,1 mM N-NH₄⁺, houve redução na atividade da PFK o que pode estar relacionado com sintomas de deficiência de N e metabolismo de senescência. As plantas IAC-47 sempre apresentaram maior atividade de PFK.

A característica adaptativa de reduzida degradação de açúcares solúveis nas plantas Piauí seria resposta aos níveis mais elevados de glutamato provenientes da atividade exacerbada da GDH, principalmente no tratamento com 1,0 mM N-NH₄⁺. Por outro lado, em plantas IAC-47 o amônio foi absorvido pela via das enzimas GS/GOGAT, formando glutamina. Apesar disso, há nas plantas IAC-47 crescidas a 0,1 mM N-NH₄⁺ alta atividade de desaminação pela GDH, certamente relacionada aos sintomas de deficiência. Assim, plantas IAC-47 utilizaram-se da GDH para manter os níveis de α -cetoglutarato para o Ciclo de Krebs.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, S.L. e YOUNATHAN, E.S. Modulation of the Kinetic Properties of Phosphofructokinase by Ammonium Ions. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 246, N°8, p. 2464-2467, 1971.
- AGRITEMPO. Sistema de Monitoramento Agrometeorológico. Disponível em www.agritempo.gov.br, consultado em 12 dez. 2005.
- ARF, O.; RODRIGUES, R.A.F.; de SÁ, M.E.; CUSCIOL, C.A.C. e PEREIRA, J.C.dos R.P. Preparo do Solo, Irrigação por Asperção e Rendimento de Engenho do Arroz de Terras Altas. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, V.59, n.2, p.321-326, abr/jun. 2002
- BAPTISTA, J.A.; FERNANDES, M.S. E SOUZA, S.R. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular das cultivares de arroz Agulha e Bico Ganga. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, DF, v35, n7, p.1325-1330, 2000.
- BARRADAS, C.A.A.; FREIRE, L. R.; DE ALMEIDA D.L. e DE-POLLI, H. Comportamento de adubos verdes de inverno na Região serrana fluminense. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, DF, v 36, n12, p.1461-1468, 2001.
- BERGERSEN, F. J. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. In: **Enzymes involved in metabolism related to nitrogenase**. John Wiley and Sons, Hoboken, p.279-305, 1980.
- BIEMELT, S.; HAJIREZAEI, M.R.; MELZER, M.; ALBRECHT, G e SONNEWALD, U. Sucrose synthase activity does not restrict glycolysis in roots of transgenic potato plants under hypoxic conditions. **Planta**, Berlin, 210, p.41-49, 1999.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72, p.248-254. 1976.
- BRITTO, D.T.; GLASS, A.D.M.; KRONZUCKER, H.J. e SIDDIQI, M.Y. (a) Cytosolic Concentration and Transmembrane Fluxes of $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. An Evaluation of Recent Proposals. **Plant Physiology**, Rockville, vol. 125, p.523526, 2001.
- BRITTO, D.T.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. e KRONZUCKER, H.J. (b) Futile transmembrane NH_4^+ cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **PNAS**, New York, vol. 98, n° 7, p.4255-4258, 2001.
- BUCHAMAN-WOLLASTON, V. The molecular biology of leaf senescence. **J. of Experimental Botany**, London, vol. 48, n°3, p.181-199, 1999.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. London: Thomas Nelson, V.1. 1968.

da SILVA, E.F.; ANDO, A.; MONTALVÁN R. e NETO, A.T. Método prático para cultivo de espécie silvestre do gênero *Oryza*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, V.56, n.4, p.1005-1007, Oct/Dec.1999.

DUBOIS, F.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALEZ-MORO, M-B; ESTAVILLO, J-M.; SANGWAN, R.; GALLAIS, A. e HIREL, B. Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? **Plant. Physiology and Biochemistry**, Heraklion, 41, p.565-576, 2003.

FAGERIA, N.K. (a) Avaliação do estado nutricional do arroz, In: BRESEGHELLO, F. e STONE, L.F. (Eds). **Tecnologia para arroz de terras altas**. EMBRAPA, Santo Antônio de Goiás, Cap.9, 59-66p, 1998.

FAGERIA, N.K. (b) Manejo da calagem e adubação do Arroz, In: BRESEGHELLO, F. e STONE, L.F. (Eds). **Tecnologia para arroz de terras altas**. EMBRAPA, Santo Antônio de Goiás, Cap.10, 66-78, 1998.

FERNANDES, M.S. **Absorção e Metabolismo de Nitrogênio em Plantas**. Boletim técnico n1, UFRRJ, Itaguaí, p.50, 1978.

FERNANDES, M.S. N-carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, San Jose, V.33, p.297-301. 1983.

FERNANDES, M.S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice. **Turrialba**, San Jose, V.34, p.9-18. 1984.

FERNANDES, M.S. Efeitos de fontes e níveis de Nitrogênio sobre a absorção e assimilação de N em arroz. **Rev. Bras. de Fisiol. Vegetal**, Londrina, 2 (1), p.71-76, 1990.

FERNANDES, M.S. e ROSSIELLO, O.R. Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, New York, 14(2), p.111-148, 1995.

FERRAZ JR., A.S. de L., SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. e ROSSIELLO, R.O.P. Eficiência no Uso de Nitrogênio para a Produção de Grão por Cultivares de Arroz. **Pesq. agropec. Bras.**, Brasília, v.32, n.4, p.435-442, 1997.

FERRAZ JR., A.S. de L., SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M. e FERNANDES, M.S. Crude Protein in Rice Grown in Different Environmental Conditions. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, New Delhi, 7(2), p.149-157, 2001.

FISKE, C. F. e SUBARROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 66:375-400, 1925.

GAZZARINI, S.; LEJAY, L.; GOJON, A.; NINNEMANN, O.; FROMMER, W.B. e VON WIRÉN, N. Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. **The Plant Cell**, Rockville, vol.11, p.937-947, 1999.

GOLLDACK, D. e DIETZ, K.J. Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. **Plant Physiology**, Rockville, 125:1643-1654, 2001.

GRAZINOLI-GARRIDO, R. **Atuação de Solventes Orgânicos na Catálise Homogênea pela Pirofosfatase Inorgânica Citosólica de Leveduras**. Tese de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Rio de Janeiro, UFRJ, 2001, 60p.

GRAZINOLI-GARRIDO, R. e SOLA-PENNA, M. Inactivation of yeast inorganic pyrophosphatase by organic solvents. **An Acad Bras. Cienc**, Rio de Janeiro, 76 (4), p. 699-705, 2004.

HIREL, B.; ANDRIEU, B.; VALADIER, M-H; RENARD, S.; QUILLERÉ, I.; CHELLE, M.; POMMEL, C. e DROUET, J-L.(a) Physiology of maize II: Identification of physiological markers representative of the nitrogen status of maize (*Zea mays*) leaves during grain filling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 124, p.178-188, 2005.

HIREL, B.; MARTIN, B.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; GONZALEZ-MORO, M-B. e ESTAVILLO, J-M. Physiology of maize I: A comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in C4 plant. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, 124, p.167-177, 2005 (b).

HOAGLAND, D. R. e ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn. Bull.**, Berkely, 347:1-32, 1950.

HOWITT, S. M. e UDVARDI K.M. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, 1465, p.152-170, 2000.

IBGE. Levantamento Sistemáticos da Produção Agrícola. Disponível em www.ibge.gov.br, consultado em 10 fev. 2007.

KAWASAKI-NISHI, S., NISHI, T. e FORGAC, M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. **FEBS**, Copenhagen, 545:76-85, 2003.

KLUGE, C. LAHR, J., HANITZSCH, M., BOLTE, S., GOLLDACK, D. e DIETZ, K.-J. New Insight Into the Structure and Regulation of the Plant Vacuolar H⁺-ATPase. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, Amsterdam, 35(4):2003.

KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. e KIRK, G.J.D. Nitrate-ammonium synergism in rice. A subcellular flux analysis. **Plant. Physiology.**, Rockville, 119, p.1041-1046, 1999.

KRONZUCKER, H.J.; GLASS, A.D.M.; SIDDIQI, M.Y. e KIRK, G.J.D. Comparative kinetic analysis on ammonium and nitrate acquisition by tropical lowland rice: implications for rice cultivation and yield potential. **New Phytol.**, Oxford, 145, p.471-476, 2000.

KUMAR, A.; SILIM, S.N.; OKAMOTO, M.; SIDDIQI, M.Y. e GLASS, A.D.M. Differential expression of three members of the *AMT1* gene family encoding putative high-affinity NH₄⁺ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies *indica*. **Plant. Cell and Environment**, Oxford, 26, p. 907-914, 2003.

LEA, P.J. e MIFLIN, B. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant. Physiology and Biochemistry**, Heraklion, 41, p.555-564, 2003.

LANCIEN, M.; GADAL, P. e HODGES, M. Enzyme Redundancy and the Importance of 2-Oxoglutarate in Higher Plant Ammonium Assimilation. **Plant Physiology.**, Rockville, 123, p.817-824, 2000.

LICHTEHTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PAECKER, L e DOUCE, R (eds). **Methods in Enzymology**. Academic Press, London, v.148, p350-382, 1987.

LIMA, M.G.S.; LOPES, N.F.L.; BACARIN, M.A. E MENDES, C.R. Efeito do estresse salino sobre a concentração de pigmentos e prolina em folhas de arroz. **Bragantia**, Campinas, v.63, n.3, p.335-340, 2004.

LUDEWIG, U.; VON WIRÉN, N. e FROMER, W.B. Uniport of NH_4^+ by root hair plasma membrane ammonium transporter LeAMT 1.1. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 277, p.13548-13555, 2002.

MAESHIMA, M. NAKANISHI, Y, MATSUURA-ENDO, C. e TANAKA, Y. Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells. **J. Plant Res.**, Tokyo, 109, p.119-125, 1996

MAESHIMA, M. Tonoplast Transporters: Organization and Function. **Annu.Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.**, Palo Alto, 52, p. 469-497, 2001.

MAGALHÃES J.R.; HUBER, D.M. e TSAI, C.Y. Evidence of Increased ^{15}N -ammonium assimilation in tomate plants with exogenous α -ketoglutarate. **Plant Science**, Amsterdam, 85, p.135-141, 1992.

MAJEROWICZ, N., PEREIRA, J.M.S.; MEDICI, L.O.; BISON, O.; PEREIRA, M.B. e JÚNIOR, U.M.S. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasil. Bot.**, São Paulo, V.25, n. 2, p.129-136, 2002.

MANDOUX, O.; BATOKO, H.; OECKING, C.; GEVAERT, K.; VANDEKERCKHOVE, J.; BOUTRY, M. e MORSOMME, P. A Plant Plasma Membrane H^+ -ATPase Expressed in Yeast Is Activated by Phosphorylation at Its Penultimate Residue and Biding of 14-3-3 Regulatory Proteins in the Absence of Fusicoccin. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 275, p.17762-17770, 2000.

MARTIN, A., LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, C.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TÈRCE-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, A.; GONZALES-MORO, M-B.; BITHENCOURT, L.; HABASH, D. Z.; LEA, P. J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K. J. e BERTRAND, H. Two Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms of Maize are Specifically Involved in the Control of Grain Production. **The Plant Cell On Line**, disponível em www.aspb.org, consultado em 12 mar. 2007, p.1-23.

MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M.; PAGEAU, K.; LELANDAIS, M.; GRANDJEAN, O.; KRONENBERGER, J.; VALADIER, M-H; FERAUD, M.; JOUGLET T. e SUZUKI, A. Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway and Glutamate Dehydrogenase Play Distinct Roles in the Sink-Source Nitrogen Cycle in Tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, vol. 140, p. 444-456, 2006.

MENDONÇA, R.J.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M.A. e OLIVEIRA, J.A. Capacidade de cultivares de arroz de modificar o pH de soluções nutritivas na presença de alumínio. **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, DF, v.40, n.5, p.447-452, 2005.

MITCHELL, H. T. Microdetermination of nitrogen in plant tissue. **Journal of Association Official Agriculture**, Gaithersburg, v. 55, p. 1-3, 1972.

MORAES, J.F.V. Solos. In: VIEIRA, N.R.A.; DOS SANTOS, A.B. e SANT'ANA, E.P (Eds). **A Cultura do arroz no Brasil**. ed. EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás. Cap. 4, p.89-116, 1999.

NOJI, H., YASUDA, R., YOSHIDA, M. e KINOSITA, K., JR. Direct observation of the rotation of F₁-ATPase. **Nature**, London, 386, 299–302, 1997.

NOJI, H., HÄSLER, K., JUNGE, W. KINOSITA-JR.,K., YOSHIDA, M., e ENGELBRECHT, S. Rotation of *Escherichia coli* F₁-ATPase. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, New York, 260, 597–599, 1999.

OLIVARI, C; ALBUMI, C.; PUGLIARELLO, M,C.; e DE MICHELIS, M. I. Phenylarsine Oxide Inhibits the Fusicoccin-Induced Activation of Plasma Membrane H⁺-ATPase. **Plant. Physiol.**, Rockville, 122, p.463-470, 2000.

OLSSON, A; SVENNELID, F.; EK, B.; SOMMARIN, M. e LARSSON, C. A Phosphothreonine Residue at the C-Terminal End of the Plasma Membrane H⁺ATPases Is Protected by Fusicoccin-Induced 14-3-3 Binding. **Plant. Physiol.**, Rockville, 118, p.551-555, 1998.

PALMGREN, M.G. Plant Plasma Membrane H⁺ATPases: Powerhouses for Nutrition Uptake. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **Plant Mol. Biol.**, Palo Alto, 52, p.817-845, 2001.

PASSONNEAU, J. V. e LOWRY, O.H. Phosphofructokinase and the Pasteur effect. **Bioch. Biophys. Res. Commun.**, New York, 7, p.10-15, 1962.

PARMEGGIANI, A e BOWMAN, R.H. Regulation of phosphofructokinase activity by citrate in normal and diabetic muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, 12, p.268 - 273, 1963.

PILKIS, S. J., MAGRABI, M. R., PILKIS, J., CLAUS, T.H. e CUMMING, D.A. A new activator of phosphofructokinase. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 256, p.3171-3174, 1981.

PINHEIRO, B. da S. Características Morfofisiológicas da Planta Relacionadas à Produtividade. In: VIEIRA, N.R.A.; DOS SANTOS, A.B. E SANT'ANA, E.P (Eds). **A Cultura do arroz no Brasil**. Ed. EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás. Cap. 5, p.117-148, 1999.

PODESTÁ, F. e PLAXTON, W.C. Fluorescence study of ligand binding to potato tuber pyrophosphate-dependent phosphofructokinase: evidence for competitive binding between fructose-1-6-bisphosphate and fructose-2-6-bisphosphate. **Arch. of Bioch. and Biophys.**, 414, p.101-107, 2003.

RAMOS, A.C.; MARTINS, M.A. e FAÇANHA, A.R. Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microsomas de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. **R. Bras. Ci. Solo**, Viçosa, 29, p.207-213, 2005.

RASI-CALDOGNOV, F; PUGLIARELLO, M,C.; OLIVARI, C. e DE MICHELIS, M. I. Cotrolled Proteolysis Mimics the Effect of Fusicoccin on the Plasma Membrane H⁺-ATPase. **Plant. Physiol.**, Rockville, 103, p.391-398, 1993.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F. e EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 6ª Ed., 2001, 906p.

ROBERTS, D. e KELLET, G.L. The kinetics of effector binding to phosphofructokinase. The binding of Mg^{2+} -1,N⁶-Ethenoadenosine triphosphate to the catalytic site. **Biochem. J.**, Essex, 189, p.561-567, 1980.

ROBERTS, G. e BEAUGÉ, L. Complex ATP-activation kinetics of plant H^+ -transporting ATPase may or may not require two substrate sites. **Eur. J. Biochem.**, Copenhagen, 246, p.228-232, 1997.

RODRIGUES, F.de S. **Metabolismo de nitrogênio em arroz cultivado sob fluxo sazonal de nitrato**. Tese de Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo, Seropédica, UFRRJ, 2001, 119p.

RODRIGUES, F.de S. **Absorção e Compartimentalização do Nitrogênio em Plantas de Arroz Submetidas ao Fluxo Sazonal de NO_3^-** . Tese de Doutorado em Agronomia-Ciência do Solo, Seropédica, UFRRJ, 2005, 89p.

RODRIGUES, F.de S. e GRAZINOLI-GARRIDO, R. Fluxo Sazonal de NO_3^- no Trópico Úmido. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**. Garças, Ano IV, N. 8, p. 01-09, 2005.

RROÇO, E.; KOSEGARTEN, H. e MENGEL, K. Importance of plasmalemma H^+ -ATPase activity for N losses from intact roots of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **European Journal of Agronomy**, Copenhagen, 16, p.187-196, 2002.

SANTOS, A.C.; SILVA, W.S. DA; DE MÉIS, L. e GALINA, A. Próton Transport in Maize Tonoplasts Supported by Fructose-1-6-Bisphosphate Cleavage. Pyrophosphate-Dependent Phosphofructokinase as a Pyrophosphate-Regenerating System. **Plant Physiology**, Rockville, Vo. 133, p.885-892, 2003.

SANTOS, A.M.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. e SOUZA, S.R. DE. Teores de nitrogênio, fósforo e frações solúveis em duas variedades de arroz cultivadas em solução nutritiva sob dois níveis de nitrato. **Agronomia**, Seropédica, V.37, nº1, p.76-81, 2003.

SCHMIDT, W.; MICHALKE, W. e SCHIKORA, A.. Proton pumping by tomato roots. Effect of Fe deficiency and hormones on the activity and distribution of plasma membrane H^+ -ATPase in rhizodermal cells. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, 26, p.361-370, 2003.

SERRANO, R. H^+ -ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. **Methods Enzymol**, New York, 157:533-544, 1988.

SOLA-PENNA, M.; DOS SANTOS, A.C.; ALVES, G.G.; EL-BACHA, T.; FABER-BARATA, J.; PEREIRA, M.F.; SEREJO, F.C.; DA POIAN, A.T. e SORENSON, M.. A radioassay for phosphofructokinase-1 activity in cell extracts and purified enzyme. **J. Biochem. Biophys. Methods**, Amsterdam, 50, p.129-140, 2002.

SOUZA, S.R. e FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: Fernandes, M.S. (Ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Ed. SBCS. Viçosa. Cap. IX, p.215-252, 2006.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. e MAGALHÃES, J.R. Effect of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crude protein of rice. **Commun. Soil. Sci. Plant. Anal.**, 30 (5e 6), p.711-724, 1999.

SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M. e FERNANDES, M.S. **Enzimas de Assimilação de Nitrogênio em Plants**. ed. Artware Projetos Culturais. Niterói, 2002, 55p.

SOUZA-SANTOS, P.; RAMOS, R.S.; FERREIRA, S.T. e CARVALHO-RAMOS, P.C. Iron-induced oxidative damage of corn root plasma membrane H⁺-ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, 1512, p.357-366, 2001.

STEINMETZ, S. E MEIRELES, E.J.L. CLIMA. IN: VIEIRA, N.R.A; DOS SANTOS, A.B e SANT'ANA, E.P. (Eds). **A Cultura do arroz no Brasil**. ed. EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás. Cap. 3, p.59-88, 1999.

STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W-R. e KRAPP, A. Steps towards an integrates view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany**, Vol. 53, No. 370, p. 959-970, 2002

SUGDEN, P.H. e NEWAHOLME, E.A. The Effects of Ammonium, Inorganic Phosphate and Potassium Ions on the Activity of Phosphofructokinase from Muscle and Nervous Tissues of Vertebrates and Invertebrates. **Biochem. J.**, Essex, 150, p. 113-122, 1975.

SZE, H.; LI, X. e PALMGREN M. G. Energization of plant cell membranes by H⁺-Pumping ATPases: Regulation and biosynthesis. **The Plant Cell**, Rockville, 11:677-689, 1999.

TEDESCO, M.J. **Extração simultânea de N, P, K Ca e Mg em tecidos de plantas por digestão com H₂O₂ e H₂SO₄**. Apostila 23, Porto Alegre, 1983.

TRIVELIN, P.C.O.; DE OLIVEIRA, M.W.; VITTI, A.C.; GAVA, G.J.D.E.C. e BENDASSOLI, J.A. Perdas do Nitrogênio da Uréia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, DF, v37, n2, p.193-201, 2002.

TURPIN, D.H.; BOTHA, F.C.; SMITH, R.G.; FEIL. R.; HORSEY, A.K. e VANLERBERGHE, G.C. Regulatoin of Carbon Partitioning to Respiration during Dark Ammonium Assimilation by Green Alga *Selenastrum minutum*. **Plant. Physiol**, Rockville, 93, p.166-175, 1990.

UYEDA, K., FURUYA, E. e LUBY, L.J. The effect of natural and synthetic D-fructose 2,6-bisphosphate on the regulatory kinetic properties of liver and muscle phosphofructokinases. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 256, p.8394-8399, 1981.

Van DOMMELEN, A., DE MOT, R. e VANDERLEYDEN, J. Ammonium transport: unifying concepts and unique aspects. **Plant Physiology**, 28, p.956-967, 2001.

Van LOON, G.W. e DUFFY, S.J. **Environmental Chemistry**. Oxford University Press, New York, 2001, 492p.

VERGARA, B.S. Plant growth and development. **Rice ProductionIn:Manual**, University of Philippines. Laguna, p.17-37. 1970.

VERGARA, B.S.; CHANG, T.T. AND LILIS, R. The flowering response of the rice plant to photoperiod: a review of literature. **Los Baños:IRRI**, Manila, 75p. 1969.

WANG, M.Y.; GLASS, A.D.M.; SHAFF, J.E. e KOCHIAN, L.V. Ammonium Uptake by Rice Roots. III. Electrophysiology. **Plant. Physiol**, Rockville, 104, p.899-906, 1994.

WANG, R.; GUEGLER, K.; LABRIE, S. e CRAWFORD, N.M. Genomic Analysis of a Nutrient Response in Arabidopsis Reveals Diverse Expression Patterns and Novel Metabolic and Potential Regulatory Genes Induced by Nitrate. **The Plant. Cell**, Rockville, 12, p.1491-1509, 2000.

WILLIAMS, L.E e MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.**, Palo Alto, 52, p.659-688, 2001.

XU, T., VASILYEVA, E. e FORGAC, M. Subunit interactions in the clathrin-coated vesicle vacuolar (H⁺)-ATPase complex. **J. Biol. Chem.**, Maryland, 274:28909-28915, 1999.

YAN, F; FUERLE, R.; SCHÄFFER, S.; FORTMEIER, H. e SCHUBERT, S. Adaptation if Active Proton Pumping and Plasmalemma ATPase Activity of Corn Roots to Low Root Medium pH. **Plant. Physiol**, Rockville, 117, p.311-319, 1998.

YEMM, E. W. e WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. **Biochem. J.**, London, V.57, p.508-514, 1954.

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

YOKOHAMA, L.P. Aspectos Conjunturais e Custo da Produção do Arroz. In: **Tecnologia para o arroz de terras altas**. ed. EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás. Cap. 1, 9-14, 1998.

YOKOHAMA, L.P.; RUCATTI, E.G. e KLUTHCOUSKI, J. Economia da Produção: Conjuntura, Mercado e Custos. In: **A Cultura do arroz no Brasil**. Ed. EMBRAPA. Santo Antônio de Goiás. Cap. 2, p. 37-58, 1999.

YOSHIDA, S., UEMURA, M., NIKI, T., SAKAI, A. e GUSTA, L. V. Partition of Membrane Particles in Aqueous Two-Polymer Phase System and Its Practical Use for Purification of Plasma Membranes from Plants. **Plant Physiology**, Rockville, 72, 105-114, 1983

ZONTA, E.; BRASIL, F, D.A.C; GOI, S.R. e da ROSA, M.M.T. O Sistema Radicular e suas Interações com o Ambiente Edáfico. In: Fernandes, M.S. (Ed.) **Nutrição Mineral de Plantas**. Ed. SBCS. Viçosa. Cap. II, p. 7-52, 2006.