

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Parâmetros cinéticos da absorção de amônio e expressão
gênica dos transportadores OsAMT1 em variedades de
arroz (*Oryza sativa* L.).**

Vinícius Miranda de Souza

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO FITOTECNIA

**PARÂMETROS CINÉTICOS DA ABSORÇÃO DE AMÔNIO E
EXPRESSÃO GÊNICA DOS TRANSPORTADORES OSAMT1 EM
VARIEDADES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.).**

VINÍCIUS MIRANDA DE SOUZA

Sob a Orientação do Professor

Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação da Professora

Sonia Regina de Souza

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no curso de Pós graduação em Fitotecnia.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2010

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

VINÍCIUS MIRANDA DE SOUZA

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

TESE APROVADA EM 25/02/2010

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

Munir Mauad. Dr. UFGD

Cristiane Martins Cardoso de Salles. Dr. UFRRJ

A Deus, pela presença e auxílios enviados todas as vezes que precisei para me manter forte na busca dos meus objetivos.

Aos meus amados pais, Raimundo e Wilma, que sempre me deram forças e torceram por mim.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo amparo e sopros de inspiração que sempre me foi dado em todos os momentos da minha vida, principalmente nos mais difíceis e decisivos.

Aos meus pais, Raimundo e Wilma que com muito amor, carinho e compreensão me deram forças e uma base sólida onde pudesse me apoiar sempre que precisasse, e assim conseguir chegar ao fim de mais uma jornada.

Ao Prof. Dr. Manlio Silvestre Fernandes pela orientação e ensinamentos sobre pesquisa científica do qual me orgulho de ser orientado.

Ao Prof. Dr. Leandro Azevedo Santos pelo incentivo, simpatia e presteza no auxílio às atividades e discussões sobre o andamento e normatização desta Dissertação.

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

A todos os colegas de laboratório pelo apoio, conselhos e dicas fundamentais para a boa condução dos trabalhos e análises laboratoriais.

Aos colegas de classe pela espontaneidade e alegria na troca de informações e materiais numa rara demonstração de amizade e solidariedade.

Ao CPGF e sua coordenação pela atenção e carinho com que fui tratado.

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento.

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

BIOGRAFIA

Vinícius Miranda de Souza nascido em 26 de outubro de 1980, na cidade de Itaguaí-RJ. Concluiu o ensino fundamental na cidade de nascimento e o ensino médio na Colégio Cunha Mello – RJ. Em 2001, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UFRRJ, na qual foi aprovado em segundo lugar. Durante a graduação, foi estagiário por três anos e meio no laboratório de Fertilidade do Solo sob orientação do Prof. Luiz Rodrigues Freire, onde participou de trabalhos junto à equipe de estudos do núcleo de fertilidade do solo da UFRRJ. Obteve o título de Engenheiro Agrônomo em maio de 2006. Em junho de 2006, ingressou no programa de Residência ao nível de pós-graduação sob orientação do Prof. Eduardo Lima, atuando como extensionista rural no município de Vassouras – RJ onde atuou até março de 2008. Em março de 2008, ingressou no programa de pós-graduação ao nível de mestrado, em Fitotecnia na UFRRJ e foi bolsista do CNPq. Recentemente foi aprovado no curso de pós-graduação em Fitotecnia na UFRRJ a nível de doutorado o qual aguarda início em março de 2010.

LISTA DE SÍMBOLOS

AMT1	Família gênica dos transportadores de NH_4^+ de alta afinidade
CIA	Clorofórmio - álcool isoamílico 24:1
CTAB	Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromid
DAG	Dias Após a Germinação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EUN	Eficiência no uso de nitrogênio
Fd-GOGAT	Glutamato Sintase dependente de ferredoxina
GS1	Glutamina Sintetase citosólica
GS2	Glutamina Sintetase cloroplástica
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System)
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (Low Affinity Transport System)
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
NADH-GOGAT	Glutamato Sintase dependente de NADH
OsAMT	Transportador de amônio (<i>Oryza sativa</i> ammonium transporter)
OsGLT1	Glutamato Sintase dependente de NADH1
OsGLT2	Glutamato Sintase dependente de NADH2
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista das 66 variedades selecionadas para realização do Dendrograma de similaridade filogenética a partir dos produtos de amplificação por RAPD.	7
Tabela 2. Iniciadores selecionados para análise RAPD.	9
Tabela 3. Teor de proteína das variedades avaliadas. Plantas cultivadas em diferente locais (Maranhão e em estufa no campus da UFRRJ). *Araújo 2010, dados ainda não publicados.	14
Tabela 4. Reação de Síntese do cDNA utilizando o kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem).	16
Tabela 5. Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real e número de acesso dos genes para busca no site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	18

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1a:** Sistema hipotético proposto por SONODA (2003a) para regulação gênica dos transportadores de amônio em raízes em alta afinidade (HATS). 3
- Figura 1b:** Sistema que mostra o duplo papel do transportador *OsAMT1;2* na absorção de amônio pelas raízes, atuando na absorção direta do amônio da solução do solo e seu transporte célula a célula através do tecido radicular. Abreviações: ep - Epiderme, ex - Exoderme, Ed - Endoderme, sc - Estria de Caspary, co - Córtex, cl - Cilindro central e pe - periciclo. (TABUCHI et al. 2007). 4
- Figura 2.** Produto da revelação das reações de PCR dos primers OPA04, OPA07, OPA19, OPD10, OPE17, OPH05 E OPP02 em gel de agarose 1,5% coradas com brometo de etídeo. 11
- Figura 3.** Dendrograma de similaridade genética calculado pelo índice de Jaccard (1976) das variedades de arroz analisadas. 13
- Figura 4.** Avaliação da qualidade do RNA extraído. M – marcador 1Kbp Plus DNA Ladder Invitrogen®; 1 a 26 – amostras da extração de RNA das quatro repetições do experimento de expressão gênica extraídas em duplicatas. 17
- Figura 5.** Avaliação da qualidade do RNA extraído. M – marcador 1Kbp Plus DNA Ladder Invitrogen®; 27 a 52 – amostras da extração de RNA das quatro repetições do experimento de expressão gênica extraídas em duplicatas. 17
- Figura 6.** Valores de K_M e $V_{máx}$ das variedades de arroz: Manteiga, Revenda, IAC-47 e Bico Ganga, após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo 0,2 mM de N-NH₄⁺. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. 19
- Figura 7.** Depleção de N-NH₄⁺ em quatro variedades de arroz após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo 0,20 mM de N-NH₄⁺ após 24 horas de privação de N. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. 20
- Figura 8.** Valores de K_M e $V_{máx}$ das variedades de arroz: Revenda, IAC-47 e Bico Ganga, após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo 1,5 mM de N-NH₄⁺. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. 21
- Figura 9.** Depleção de N-NH₄⁺ em três variedades de arroz após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo 1,50 mM de N-NH₄⁺ após 24 horas de privação de N. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. 22
- Figura 10.** Massa fresca (g/vaso) de raiz, bainha e folha das quatro variedades (Manteiga, Revenda, IAC-47 e Bico Ganga) para a concentração de 0,2 mM de N-NH₄⁺. (A). Massa fresca (g/vaso) de raiz, bainha e folha das três variedades (Revenda, IAC-47 e Bico Ganga) para a concentração de 1,5 mM de N-NH₄⁺. (B). Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. 23
- Figura 11.** $C_{mín}$ para N-NH₄⁺ em quatro variedades de arroz. Os valores foram obtidos 24 horas após a adição de uma solução contendo 0,2 mM de N-NH₄⁺. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. 23
- Figura 12.** Teores de açúcares solúveis nas raízes bainhas e folhas de variedades de arroz submetidas a diferentes doses de N-NH₄⁺ depois de 24 horas de privação de N. Teores de açúcares solúveis 24 horas após a adição da solução contendo 0,2 mM de N-NH₄⁺. (A). Teores de açúcares solúveis 48 horas após a adição da solução contendo 1,5 mM de N-NH₄⁺. (B). Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. 24

- Figura 13.** Teores de N-amino livre nas raízes bainhas e folhas de variedades de arroz submetidas a diferentes doses de N-NH₄⁺ depois de 24 horas de privação de N. Teores de N-amino 24 horas após a adição da solução contendo 0,2 mM de N-NH₄⁺. **(A)**. Teores de N-amino 48 horas após a adição da solução contendo 1,5 mM de N-NH₄⁺. **(B)**. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. **24**
- Figura 14.** Teores de N-NH₄⁺ nas raízes bainhas e folhas de variedades de arroz submetidas a diferentes doses de N-NH₄⁺ depois de 24 horas de privação de N. Teores de N-NH₄⁺ 24 horas após a adição da solução contendo 0,2 mM de N-NH₄⁺. **(A)**. Teores de N-NH₄⁺ 48 horas após a adição da solução contendo 1,5 mM de N-NH₄⁺. **(B)**. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições. **25**
- Figura 15.** Árvore de similaridade genética baseada nas regiões codantes (CDS) do mRNA dos transportadores de amônio em arroz calculado por Neighbor-Joining.(Saitou e Nei, 1987) **26**
- Figura 16.** Expressão gênica do transportador de NH₄⁺ *OsAMT1;1* nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (locais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições. **27**
- Figura 17.** Expressão gênica do transportador de NH₄⁺ *OsAMT1;2* nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (tradicionais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições. **28**
- Figura 18.** Expressão gênica do transportador de NH₄⁺ *OsAMT1;3* nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (locais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições. **29**
- Figura 19.** Expressão gênica da enzimas de assimilação de NH₄⁺ GS e GOGAT, isoformas GS1.2 e NADH-GOGAT1 nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (locais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições. **30**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Transportadores de N-NH ₄ ⁺ (AMT)	3
2.2. Enzimas de assimilação de N e eficiência de uso de nitrogênio	5
2.2.1 Glutamina sintetase (GS)	5
2.2.2 Glutamato sintase (GOGAT)	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 Seleção das Variedades e Construção do Dendrograma de Similaridade Genética pela Técnica de RAPD	7
3.2 Condução do Experimento em Câmara de Crescimento	14
3.3 Experimentos realizados em Câmara de crescimento	14
3.3 Extração de RNA Total	15
3.4 Tratamento com DNase I e Síntese do cDNA	16
3.5 Iniciadores e Expressão Gênica por PCR em Tempo Real	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Estudo da Cinética de Absorção de Amônio	19
4.2 Estudo dos Transportadores de Amônio e Enzimas Relacionadas a Absorção	26
6 CONCLUSÕES	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

RESUMO

SOUZA, Vinícius Miranda. **Parâmetros cinéticos da absorção de amônio e expressão gênica dos transportadores OsAMT1 em variedades de arroz (*Oryza sativa* L.)**. 2010. 38f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Variedades de arroz (*Oryza sativa*) melhoradas e locais do Maranhão foram agrupadas geneticamente utilizando a técnica de RAPD. Dentre as variedades, quatro variedades contrastantes quando ao agrupamento pela técnica de RAPD foram selecionadas para estudos de cinética de absorção e expressão dos transportadores de amônio *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3*, sob o sistema de alta afinidade (HATS). As variedades foram cultivadas em câmaras de crescimento, em sistema hidropônico. Para o experimento de cinética de absorção de amônio foram separados dois grupos de plantas ao 28 dias após germinação, e após 24 horas de deficiência de N, as plantas de arroz foram transferidas para potes com duas concentrações de amônio, 0,2 mM e 1,5 mM onde foram coletadas amostras de solução para a realização da cinética de depleção de amônio e após 24 horas para a concentração de 0,2 mM e 48 horas para a concentração de 1,5 mM, as plantas foram coletadas e amostras de raiz, bainha e folha foram avaliadas quanto ao peso fresco, teores de N-amino, açúcares solúveis e N-amônio. Em um segundo experimento, as mesma variedades foram transferidas para potes com solução nutritiva com concentração de 0,2 mM de amônio, e amostras de raiz foram coletadas as duas e quatro horas após início do experimento para avaliação por real-time RT-PCR da expressão dos transportadores de amônio *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3*, e das enzimas de assimilação GS1.2 e NADH-GOGAT1. Os resultados indicam que as variedades locais apresentam uma maior expressão dos transportadores, o que está associado com maiores taxas de absorção ($V_{máx}$) e afinidade pelo amônio em solução nutritiva (K_M). Além disso, as variedades locais apresentaram menores valores de $C_{mín}$ indicando que as variedades locais são adaptadas a solos com baixas concentrações de N. Destaque para a variedade Manteiga, que apresentou os maiores níveis de expressão entre os parâmetros analisados e teve o menor $C_{mín}$ dentre as variedades analisadas.

Palavras-Chave: RAPD, EUN, Transportadores de amônio, enzimas de assimilação de amônio, arroz.

ABSTRACT

SOUZA, Vinícius Miranda. **Kinetic parameters of ammonium uptake and genetic expression of OsAMT1 transporters in varieties of rice (*Oryza sativa* L.)**. 2010. 38f. Dissertation (Master Science in Fitotecnia). Institute of Agricultural Sciences, Department of Lands, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2009.

Varieties of rice (*Oryza sativa*), improved and landrace of Maranhão, were genetically grouped using the RAPD technique. Among the varieties, four contrasting varieties for the grouping by RAPD were selected for studies of ammonium uptake kinetics and expression of ammonium transporters (*OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* and *OsAMT1;3*) under the high-affinity system (HATS). The varieties were grown in a growth chamber in hydroponic system. For the experiment of ammonium uptake kinetics, were separated two groups of plants at 28 days before seeding, and after 24 hours of N starvation, rice plants were transferred to pots with two concentrations of ammonium, 0.2 mM and 1.5 mM, where we collected samples of solution for the measuring the kinetics of depletion of ammonium, and after 24 hours for the concentration 0.2 mM and 48 hours for the concentration 1.5 mM, the plants were collected and samples of root, sheath and leaves were assessed for fresh weight, amino-N, soluble sugars and N-ammonium. In a second experiment, the same varieties were transferred to pots with nutrient solution with a concentration of 0.2 mM ammonium and root samples were collected two and four hours after the beginning of the experiment for evaluation by real-time RT-PCR for expression of the ammonium transporters (*OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* and *OsAMT1;3*), and the enzymes to assimilate (GS1.2 and NADH-GOGAT1). The results indicate that local varieties have a higher expression of the transporters, which this is associated higher rates of uptake (V_{max}) and affinity for ammonium in nutrient solution (K_M). Moreover, local varieties had lower values of C_{min} indicating that local varieties are adapted to soils with low concentrations of N. Focus on the variety Manteiga, which showed the highest levels of expression between the parameters analyzed and had the lowest C_{min} among the varieties analyzed.

Key words: RAPD, NUE, ammonium transporters, ammonium assimilation, rice

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2008), o arroz (*Oryza sativa* L.) é o alimento básico de sete países da América Latina e constitui a fonte responsável pelo suprimento de 27% da energia e 20% da proteína alimentar nos países em desenvolvimento.

No Brasil, o arroz é consumido por uma ampla parcela da população, principalmente a menos favorecida, que utiliza este cereal como alimentação básica e diária. A participação do arroz em grande proporção na dieta do brasileiro e o reduzido consumo de proteína "per capita" no país justificam a procura por variedades de arroz com alto teor de proteína nos grãos.

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

Dentre os elementos requeridos para o desenvolvimento das plantas cultivadas, o nitrogênio (N) é o exigido em maior quantidade e que, freqüentemente, limita a produtividade (GLASS et al., 2003).

No clima tropical caracterizado por uma estação que corresponde a um período de seca, seguida de outra com grande intensidade de chuvas, tem-se um fluxo sazonal da disponibilidade de nitrogênio, o que torna necessário, que as plantas cultivadas sejam eficientes na utilização deste nutriente.

Estudos apontam que aproximadamente 85 a 90 milhões de toneladas de fertilizantes nitrogenados são adicionados nos solos ao redor do mundo anualmente, e acredita-se que este valor possa chegar a 240 milhões em 2050 (GOOD et al., 2004). Tem sido estimado que 10^{11} kg de N são aplicados como fertilizantes ao redor do mundo por ano, um valor vinte vezes maior que há 50 anos, com um custo de 50 bilhões de dólares (GLASS et al., 2003). Além disso, dados experimentais apontam que por volta de 50 a 70% do nitrogênio aplicado no solo é perdido do sistema solo-planta (PEOPLES et al. 1995).

A absorção de amônio pelas plantas possui maior eficiência energética, já que o amônio tende a ser menos lixiviado no solo e sua absorção demanda menos energia das plantas, pois se encontra prontamente assimilável pelas enzimas GS/GOGAT, diferentemente com o que ocorre com o nitrato. Entretanto, quando absorvido, o amônio tem que ser rapidamente assimilado à esqueletos de carbono na produção de aminoácidos devido a sua toxidez (KRONZUCHER et al., 2001). Fato que pode ser prejudicial a sua absorção em ambientes de baixa luminosidade e temperatura.

A eficiência no uso de nitrogênio (EUN) tem sido definida como o rendimento de grãos por unidade de N disponível no solo (LEA e AZEVEDO, 2006) e esta EUN pode ser dividida em dois processos: eficiência na absorção, que é a habilidade da planta em remover o N do solo normalmente presente nas formas de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+); e eficiência na utilização, que é a habilidade da planta em transferir o N para o grão, onde predomina na forma de proteínas. Entretanto, as plantas cultivadas são capazes de converter apenas de 30 a 40% do N aplicado em produção de grãos.

Diferentemente ao que ocorre com o nitrato, as plantas em geral não tendem a acumular altas concentrações do íon amônio (LEA e AZEVEDO, 2006).

As proteínas transportadoras de NH_4^+ são codificadas por uma família multigênica e apresentam ampla variação de padrões de cinética de absorção, fato que demonstra a plasticidade das plantas para a aquisição de formas reduzidas de N abundantes durante um grande período na evolução das plantas superiores. Contudo, da mesma forma que acontece

para a absorção de nitrato, a absorção de NH_4^+ é feita por um sistema bifásico. Quando os níveis de NH_4^+ no meio externo (solução nutritiva ou solução do solo) estão abaixo de 1 mM, opera um sistema de absorção de alta afinidade (HATS), e acima desta concentração opera o sistema de absorção de baixa afinidade (LATS).

Nitrogênio é um elemento essencial, e é constituinte de grande número de compostos importantes para o desenvolvimento da planta, incluindo aminoácidos, proteínas (enzimas), ácidos nucléicos e clorofila.

A seleção de variedades que promovam um melhor mecanismo na absorção do nitrogênio em solos de baixas concentrações é essencial para a sustentabilidade da agricultura mundial (GLASS et al. 2002), para isso é necessário um profundo entendimento das respostas, moleculares e fisiológicas, de plantas submetidas a baixas concentrações de nitrogênio.

Por necessitar de menos energia para a assimilação do amônio em relação do nitrato, esta é a forma de nitrogênio preferencialmente assimilada quando plantas são submetidas à deficiência de nitrogênio (GAZZARRINI et al. 1999).

Variedades locais que apresentam maior EUN que variedades melhoradas, sugerem que o processo de melhoramento empregado em variedades de arroz tenha sido realizado em condições nutricionais que selecionaram variedades produtivas, porém, mais exigentes em nitrogênio.

Sendo a capacidade da planta em absorver nitrogênio, um fator constituinte da sua eficiência no uso deste nutriente, o conhecimento prévio dos parâmetros cinéticos da absorção de NH_4^+ é, portanto, de fundamental importância para a continuidade dos estudos relacionados à EUN.

A determinação dos parâmetros cinéticos da absorção de NH_4^+ pelas variedades de arroz exige a realização de exaustivos experimentos com cada uma das variedades em diferentes concentrações do nutriente e a posterior análise de um grande número de amostras das soluções nutritivas nas quais as plantas foram cultivadas. Desta forma, a caracterização da diversidade genética, pode possibilitar ganho de tempo na obtenção de resultados satisfatórios, permitindo a seleção de variedades geneticamente mais distantes para a realização de experimentos, e impedindo a realização de experimentos com genótipos idênticos, que porventura estejam cadastrados como acessos distintos em um mesmo banco de germoplasma (BAG).

Com o objetivo de encontrar variedades com parâmetros distintos de absorção e expressão dos transportadores de amônio de alta afinidade e das enzimas de assimilação do ciclo glutamina sintetase (GS)/glutamato sintase (GOGAT), variedades de arroz foram selecionadas com base na divergência genética determinada por polimorfismos através da técnica de RAPD.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Transportadores de N-NH₄⁺ (AMT)

As plantas em geral não tendem a acumular altas concentrações do íon amônio (LEA e AZEVEDO, 2006), principalmente por ser tóxico quando está dentro da planta. As proteínas transportadoras de NH₄⁺ são codificadas por uma família multigênica e apresentam ampla variação de padrões de cinética de absorção, fato que demonstra a plasticidade das plantas para a aquisição de formas reduzidas de N, abundantes durante um grande período na evolução das plantas superiores.

A absorção de NH₄⁺ é feita por um sistema bifásico. Quando os níveis de NH₄⁺ no meio externo (solução nutritiva ou solução do solo) estão abaixo de 1 mM, opera um sistema de absorção de alta afinidade (HATS), e em concentrações superiores a esta, opera o sistema de absorção de baixa afinidade (LATS).

A expressão dos genes que codificam transportadores de amônio em arroz (OsAMTs) apresentam perfis distintos. *OsAMT1;1* é um gene constitutivo, expresso tanto na raiz quanto na parte aérea, enquanto os genes *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3* tem sua expressão específica em raízes, sendo que o primeiro responde positivamente a disponibilidade de amônio enquanto o segundo tem sua expressão reprimida a disponibilidade de amônio. (SONODA et al. 2003a).

SONODA et al. (2003b) sugerem que a regulação dos transportadores de NH₄⁺ responsáveis pela absorção, são controlados pelos teores de glutamina no interior das raízes e não pelos teores de amônio em solução (Figura 1a). Isso demonstra um controle interno à absorção de amônio indicando uma adaptação das variedades de arroz ao diferentes níveis de nitrogênio na solução do solo.

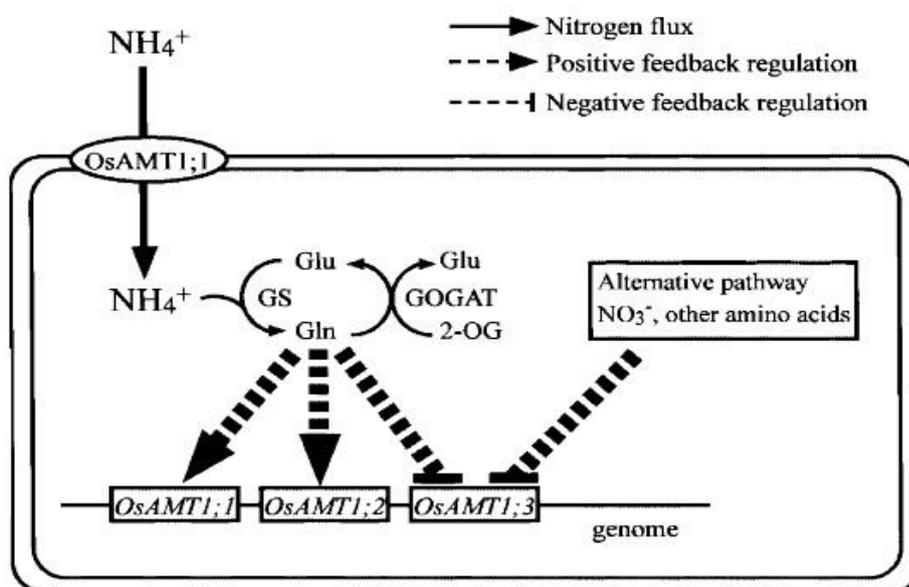


Figura 1a: Sistema hipotético proposto por SONODA (2003a) para regulação gênica dos transportadores de amônio em raízes em alta afinidade (HATS).

A expressão do transportador OsAMT1;2 foi principalmente detectada no cilindro central das raízes, sugerindo um papel importante deste, como principal transportador de amônio no interior da planta, sendo assim, o OsAMT1;2 está envolvido em 2 funções

distintas, auxiliar o transportador *OsAMT1;1* na absorção de amônio quando presente na solução do solo, e na absorção e recuperação de amônio no sistema vascular.(Figura 1b).

Os transportadores AMT de arroz possuem comportamento distintos quanto a disponibilidades de amônio no meio externo, *OsAMT1;2* responde positivamente e rapidamente a disponibilidade de amônio, indicando que seu principal papel é auxiliar o *OsAMT1;1* na absorção de amônio em solos enriquecidos, enquanto *OsAMT1;3* é induzido na ausência de amônio, o que pode estar relacionado com a absorção de amônio quando a concentração deste íon na solução do solo está muito baixa (TABUCHI et al. 2007).

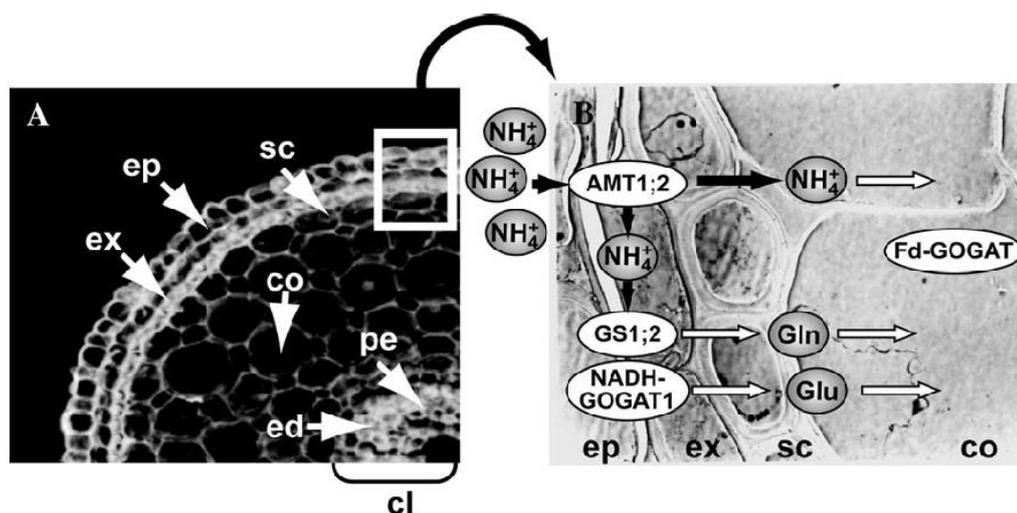


Figura 1b: Sistema que mostra o duplo papel do transportador *OsAMT1;2* na absorção de amônio pelas raízes, atuando na absorção direta do amônio da solução do solo e seu transporte célula a célula através do tecido radicular. Abreviações: ep - Epiderme, ex-Exoderme, Ed - Endoderme, sc - Estria de Caspary, co - Córtex, cl - Cilindro central e pe – periciclo. (TABUCHI et al. 2007).

Análises das seqüências de dois fragmentos e um clone de DNA indicaram que os transportadores *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3* codificam 499, 497 e 498 resíduos de aminoácidos com massa molecular de 52,6, 52,2 e 53,1 KDa respectivamente, e análises de seqüências hidrofóbicas de cadeias de aminoácidos indicam que os três transportadores *OsAMT1* provavelmente possuem 11 domínios transmembrana (SONODA et al., 2003).

Estudando o comportamento dos transportadores através do promotor *GUS*, YAO et al. (2008) verificaram que os transportadores *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3* são expressos exclusivamente em raiz durante vários estádios de desenvolvimento da planta, ambos sob condições de suprimento e deficiência de nitrogênio. A expressão desses genes em raiz sugere que ambos estão envolvidos com a absorção de nitrogênio. Os resultados encontrados indicam que os transportadores apresentam papéis distintos na absorção de nitrogênio, *OsAMT1;3* parece atuar como um sensor da presença de amônio, sendo reprimido na sua presença, e o *OsAMT1;2* aumenta a sua expressão na presença de amônio. A proposta de que o transportador *OsAMT1;3* atue como sinalizador da presença de nitrogênio ficou evidenciada devido a repressão ocorrer não só na presença de amônio, mas também na presença de nitrato.

Uma família de cinco genes transportadores de amônio (*AtAMT1;1* a *AtAMT1;5*) foi originalmente identificada em *Arabidopsis thaliana*, por similaridade com transportadores de amônio de cianobactéria, enquanto que em tomate somente três genes AMT1 foram identificados. Em ambas as plantas, uma segunda seqüência referente ao AMT2 mais parecida aos transportadores isolados de *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* foi identificada

(LOQUÉ e VON WIRÉN, 2004). Em arroz, 10 diferentes genes foram identificados e podem ser divididos em quatro grupos (SUENAGA et al., 2003).

A proteína do *AtAMT1;1* está localizada na membrana plasmática das células do córtex radicular, periciclo, epiderme e pêlos radiculares (MAYER e LUDEWING, 2006). Estudos com a técnica de inserção de T-DNA para o *AtAMT1;1* tem produzido linhagens de *A. thaliana* com apenas 30% de decréscimo na habilidade de absorver amônio com o HATS, indicando que há uma sobreposição de funções das diferentes proteínas AMT (KAISER et al., 2002).

HOQUE et al. (2006) obtiveram duas linhagens transgênicas de arroz com a superexpressão do cDNA do *OsAMT1;1* sobre o controle do promotor da ubiquitina de milho. Estes autores verificaram que as plantas transgênicas exibiram aumento nas taxas de absorção de amônio comparado com as plantas selvagens, e que a biomassa da parte aérea e sistema radicular foram menores durante a germinação e nos estágios iniciais de crescimento das plantas crescidas com alto suprimento de amônio (2 mM).

2.2. Enzimas de assimilação de N e eficiência de uso de nitrogênio

2.2.1 Glutamina sintetase (GS)

A absorção de NH_4^+ é realizada por transportadores de alta e baixa afinidade (HATS e LATS) que são codificados por uma família de genes. Após a absorção do amônio pelo sistema radicular, este deve ser rapidamente assimilado, principalmente por causa da ação tóxica do amônio. Este processo ocorre principalmente pelas enzimas do ciclo glutamina sintetase (GS)/glutamato sintase (GOGAT). (HIREL e LEA, 2002)

O NH_4^+ absorvido pelas raízes é assimilado em aminoácidos primariamente via GS/GOGAT, embora rotas alternativas, como, por exemplo, via (GDH) e asparagina sintase tenham sido propostas, mas não confirmadas (HIREL e LEA, 2002; DUBOIS et al., 2003).

A glutamina sintetase catalisa a conversão de glutamato e NH_4^+ para glutamina com gasto de ATP. Existem duas isoformas de GS: a GS citosólica (GS1), ocorrendo no citosol de raízes e células da parte aérea; e a GS plastídica (GS2), presente nos tecidos fotossintéticos, plastídio de raízes e outros tecidos não fotossintéticos. Enquanto que as enzimas GS2 e Fd-GOGAT parecem estar ligadas a reutilização de compostos nitrogenados provenientes da fotorrespiração, GS1.2 e NADH-GOGAT1 têm sua expressão aumentada em tecidos radiculares no ressuprimento de NH_4^+ , o que indica que esses genes podem ter um papel importante na assimilação de NH_4^+ em raízes de arroz. (LEA e MIFFIN, 2003)

Assim como em outras plantas, uma família multigênica que codifica GS1 tem sido identificada assim como NADH-GOGAT em arroz (TABUCHI et al. 2005), esses genes são *OsGS1.1*, *OsGS1.2* e *OsGS1.3*, e *OsNADH-GOGAT1* e *OsNADH-GOGAT2*. A expressão desses genes apresenta perfis diferentes quanto à idade da planta e o tecido analisado, e respondem a presença de NH_4^+ , indicando que cada gene apresenta uma função distinta em arroz.

Seguindo a descoberta da importância da GS e da GOGAT na assimilação do amônio em plantas superiores, vários laboratórios têm concentrado esforços para entender os mecanismos que controlam esta rota (GOOD et al., 2004). A criação de mutantes ou plantas transgênicas com níveis alterados de GS/GOGAT têm sido utilizada para determinar os efeitos destas proteínas sobre o desenvolvimento das plantas e para estudar a expressão de diferentes membros da família multigênica da GS. Duas isoformas de GS estão localizadas no

citossol (GS1) ou nos plastídeos (GS2) e tem funções específicas na assimilação ou reciclagem do amônio.

Comparando duas variedades de arroz, uma com alta EUN e outra com baixa EUN, SHI et al. (2010) observaram diferenças entre 20-30% na atividade de GS e NADH-GOGAT entre as variedades, o que sugere que GS e NADH-GOGAT possuem um papel importante na assimilação de nitrogênio em plantas jovens de arroz sob baixas concentrações de nitrogênio. Entretanto, resultados da expressão em real-time RT-PCR demonstraram que a regulação desses genes pode estar relacionada com um controle pós-transcricional.

2.2.2 Glutamato sintase (GOGAT)

A transferência redutiva do grupo amida da glutamina para o 2-oxoglutarato, para formar duas moléculas de glutamato pela enzima GOGAT é a segunda etapa do ciclo GS/GOGAT.

A glutamato sintase (GOGAT), catalisa a conversão de glutamina e 2-oxoglutarato a duas moléculas de glutamato, podendo usar ferredoxina ou NADH. Tanto a Fd- quanto a NADH-GOGAT aparentam estar localizadas somente em cloroplastos e plastídios, com uma atividade maior da Fd-GOGAT em tecidos fotossintéticos. Dois genes distintos que são diferencialmente expressos nas raízes e folhas foram encontrados para codificar a Fd-GOGAT (LEA e MIFLIN, 2003) e dois genes distintos que codificam NADH-GOGAT (*OsGLT1* e *OsGLT2*) em arroz tinham sido previamente identificadas pelos autores (ZHAO e SHI, 2006).

Estudos com diferentes espécies afirmam que, para concentrações não tóxicas de amônio, as raízes são o principal local de assimilação de NH_4^+ (ANDREWS et al., 2001). Geralmente as raízes apresentam altos níveis de GS e NADH-GOGAT e, além disso, ambas as enzimas são induzidas pelo aumento no suprimento de NH_4^+ (HIREL e LEA, 2002; ISHIYAMA et al., 2003).

Em comparação com a enzima GS, poucos estudos têm sido feitos com a produção de plantas transgênicas superexpressando genes da GOGAT (GOOD et al., 2004). Plantas transgênicas superexpressando uma GOGAT de alfafa, mostraram aumento da produção da proteína GOGAT, mas não mostraram nenhum fenótipo associado com esta característica (CHICHKOVA et al., 2001). Por outro lado, YAN et al. (2002), superexpressando a NADH-GOGAT em arroz sobre o controle do seu próprio promotor observou que as plantas transgênicas aumentaram, por volta de 80%, o peso dos grãos. Este estudo mostrou que a superexpressão de NADH-GOGAT pode ser usada como uma etapa chave no uso do nitrogênio e enchimento dos grãos em arroz e outros cereais.

A redução na atividade da GS em transgênicos de *Lotus japonicus* foi também correlacionado com um aumento no conteúdo de asparagina (HARRISON et al., 2003), apoiando a hipótese de que quando a GS se torna limitante, asparagina sintetase pode ser importante no controle do fluxo de N reduzido no interior da planta (LAM et al., 2003).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção das Variedades e Construção do Dendrograma de Similaridade Genética pela Técnica de RAPD

Originalmente 113 variedades de arroz, pertencentes a coleção de sementes do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UFRRJ, foram separadas para verificação do índice de germinação e vigor de cada variedade. Em uma seleção inicial, foram descartadas as semente das variedades que apresentaram baixos índices de germinação e vigor, restando apenas 66 variedades (Tabela1) para o estudo de diversidade filogenética pelo produto de amplificação por RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) proposto por WILLIAMS et al. (1990) e com modificações de ARAÚJO et al. (2003).

Tabela 1. Lista das 66 variedades selecionadas para realização do Dendrograma de similaridade filogenética a partir dos produtos de amplificação por RAPD.

Variedades De Arroz	Origem	Nº de Acesso
AGULHINHA BRANCO	ARARI - MA	
AGULHINHA VERMELHO	ARARI - MA	
ZEBÚ BRANCO	VIANA - MA	
LAGEADO	ARARI - MA	
AGULHINHA BRANCO	VITÓRIA DO MEARIM - MA	
CANA ROXA	VIANA - MA	
ARROZ 70	VITÓRIA DO MEARIM - MA	
BRAQUIÁRIA	VITÓRIA DO MEARIM - MA	
CUTIÃO	VIANA - MA	
MANTEIGA	PENALVA - MA	
ZEBÚ BRANCO	PENALVA - MA	
RABO DE BURRO	PENALVA - MA	
CHEQUE-CHEQUE	PENALVA - MA	
CANELA DE FERRO	MIRANDA DO NORTE - MA	
PINGO D' ÁGUA	VIANA - MA	
BACABINHA	VITÓRIA DO MEARIM - MA	
ZEBÚ BRANCO	VITÓRIA DO MEARIM - MA	
LAGEADO LISO	VITÓRIA DO MEARIM - MA	
TRÊS MESES	VITÓRIA DO MEARIM - MA	
PALHA MURCHA	PENALVA - MA	
NIPPONBARE	JAPÃO	
VERMELHO 1		
LAGEADO SEM PÊLO		220018
VERMELHO 3		
AGULHINHA VERMELHO		
LAGEADO		790001
LAGEADO LISO		220029
BACABINHA		790157
JATOBA		790165
BACABA		790098
BACABINHA		220027
CANELA DE FERRO		790164
LAGEADO		220006
PINGO D' ÁGUA		790148
RABO DE BURRO	MARANHÃO - MA	790006
COME CRU VERMELHO	MARANHÃO - MA	790034

PALHA MURCHA	MARANHÃO - MA	790008
AGULHA		790057
GOIANO		780165
LAGEADO		840118
IAC-25		2020
LIGEIRO	MARANHÃO - MA	790102
SAGRIMÃO	MARANHÃO - MA	790138
BICO GANGA		790180
COMUM BRANCO	MARANHÃO - MA	790160
IAC-1278		
DOBRADINHO		790054
LIGEIRO VERMELHO		790052
ZEBÚ BRANCO		790121
ARROZ DE REVENDA	MARANHÃO - MA	790088
ZEBÚ		790028
IR-08	FILIPINA	
TRÊS MESES (ANA)		
LAGEADO		
BONANZA		
COME CRU VERMELHO (ANA)		
IAC-202	IAC-SP	
IAC-47	IAC-SP	
DOURADO PRECOCE		
IAC-4440	IAC-SP	
IAC-600	IAC-SP	
ESPADÃO		IN-24
SBT-33 (LINH. AROMÁTICA)		
ARARIBA (ALAGADO)	ARARI - MA	
DONGJIN	JAPÃO	
PIAUÍ		

Inicialmente, de 10 a 30 sementes de cada variedade foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 2 a 3% por 15 minutos, e em seguida lavadas com água destilada em abundância até remover todo hipoclorito de sódio. Logo após, as sementes foram colocadas para germinar em recipientes de 0,5 L, com o fundo cortado cobertos com uma dupla camada de gaze, de modo a impedir a imersão das sementes e em seguida esse copo foi inserido dentro de outro recipiente maior, de 0,7 L, e seu volume completado com água destilada, de modo que as sementes dispostas sobre a dupla camada de gaze ficassem sempre em contato com a água.

Quando as plantas atingiram 10 a 15 cm de altura, o tecido vegetal da parte aérea foi coletado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior extração do DNA.

A extração de DNA foi realizada com a metodologia de FERREIRA e GRATAPAGLIA (1998). Uma quantidade de aproximadamente um grama de tecido vegetal de cada variedade foi macerada em N₂ líquido até que o material fosse totalmente pulverizado e então, aproximadamente 200 mg material foi transferido para microtubo ependoff de 1,5 mL, e em seguida foram adicionados 700 µL de solução tampão de extração (2% de CTAB; 1,4 mM de NaCl; 20 mM de EDTA; 100 mM Tris-HCl e 1% de mercaptoetanol). A mistura foi homogeneizada agitando-se por inversão por aproximadamente 20 vezes e incubada em banho-maria a 65 °C por 30 minutos. Durante a incubação, as amostras foram agitadas 10 vezes por inversão em dois momentos (10 e 20 minutos após início da incubação).

Para o primeiro fracionamento, foram adicionados 600 µL de CIA (Clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) e então o material foi homogeneizado por agitação em vórtex durante 5 minutos. O material homogêneo foi então centrifugado a 16.000g por 5 minutos e o sobrenadante foi recolhido e transferido para novos microtubos.

Aos novos microtubos contendo a fase aquosa, foram adicionados 50 µL de uma solução contendo 10% de CTAB e 1,4 mM NaCl e a mistura foi homogeneizada por inversão e em seguida foi realizada a segunda partição com 600 µL de CIA. Após a segunda centrifugação, a fase aquosa foi transferida para novos microtubos e foram adicionados 280 µL de isopropanol frio (-20°C) e em seguida as amostras foram colocadas em freezer a -80°C por 30 minutos, para precipitação dos ácidos nucleicos. Após este período, uma nova centrifugação a 12.000g por cinco minutos foi realizada e o sobrenadante descartado. O pellet formado no fundo do microtubo foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70%, para remover o excesso de sais, seguido de uma última lavagem com etanol absoluto.

As amostras foram colocadas para secar em câmara de fluxo por aproximadamente 10 minutos, até evaporar todo o etanol, em seguida o pellet foi ressuspensão em 100 µL de tamão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e as amostras foram guardadas em freezer -80°C, para futuras análises.

Após esse processo, o material genômico foi quantificado em Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer® e da solução estoque foi retirado uma alíquota, a qual foi diluída em TE para 100 µL, na concentração final de 12,5 ng µL⁻¹.

A partir da consulta a trabalhos sobre análises de RAPDs com arroz, obteve-se 50 primers que foram classificados em ordem decrescente do número de bandas polimórficas obtidas nos trabalhos. Em seguida, foram selecionados os 26 que apresentaram maior número de bandas polimórficas nos trabalhos analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Iniciadores selecionados para análise RAPD.

INICIADORES	SEQÜÊNCIAS DE BASES	FONTE CONSULTADA
OPB – 17	5'-AGGGAACGAG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA – 17	5'-GACCGCTTGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA – 19	5'-CAAACGTCCG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE – 17	5'-CTACTGCCGT-3'	BAPTISTA et al. (2002)
OPA – 20	5'-GTTGCGATCC-3'	RABBANI et al. (2008)
OPB – 08	5'-GTCCACACGG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA – 18	5'-AGGTGACCGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA – 08	5'-GTGACGTAGG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE – 19	5'-ACGGCGTATG-3'	BAPTISTA et al. (2002)
OPD – 18	5'-GAGAGCCAAC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPL – 16	5'-AGGTTGCAGG-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPB – 11	5'-GTAGACCCGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE – 18	5'-GGACTGCAGA-3'	BAPTISTA et al. (2002)
OPD – 10	5'-GGTCTACACC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPH – 05	5'-AGTCGTCCCC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPP – 02	5'-TCGGCAGCA-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPA – 04	5'-AATCGGGCTG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA – 07	5'-GAAACGGGTG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPB – 07	5'-GGTGACGCAG-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE – 20	5'-AACGGTGACC-3'	BAPTISTA et al. (2002)

OPH – 08	5'-GAAACACCCC-3'	BHUYAN et al. (2007)
OPB – 13	5'-TTCCCCCGCT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPA – 09	5'-GGGTAACGCC-3'	RABBANI et al. (2008)
OPB – 18	5'-CCACAGCAGT-3'	RABBANI et al. (2008)
OPE – 07	5'-AGATGCAGCC-3'	BAPTISTA et al. (2002)
OPB – 10	5'-CTGCTGGGAC-3'	BHUYAN et al. (2007)

Com base na consulta de trabalhos sobre RAPD em arroz (BAPTISTA et al. 2002, BHUYAN et al. 2007 e RABBANI et al. 2008), as reações de PCRs foram planejadas para um volume final de 20 μ L, contendo 25 ng de DNA genômico, 2,3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 0,2 μ M de primer, uma unidade de Taq DNA polimerase recombinante Invitrogen® e 2 μ L do tampão da enzima, sendo o volume final completado com água UP (ultra pura). As condições de temperatura foram 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação), 38°C por um minuto (anelamento), 72°C por dois minutos (extensão) e mais cinco minutos a 72°C ao final do ultimo ciclo para extensão final.

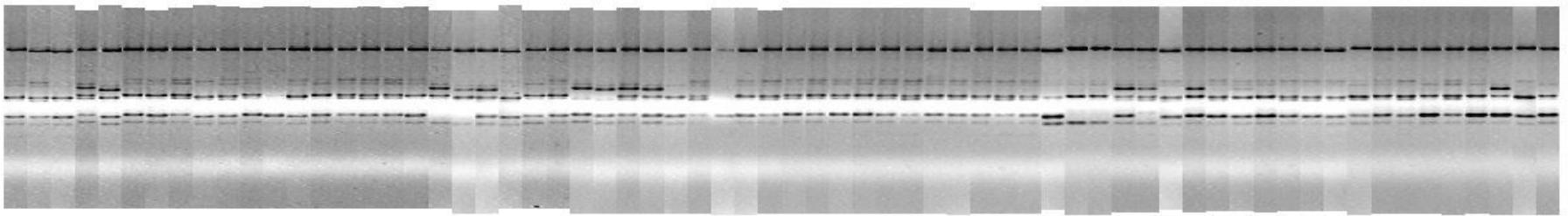
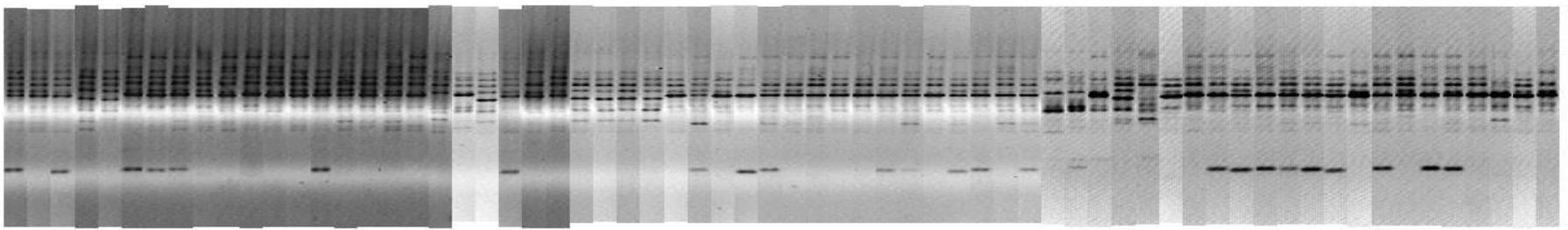
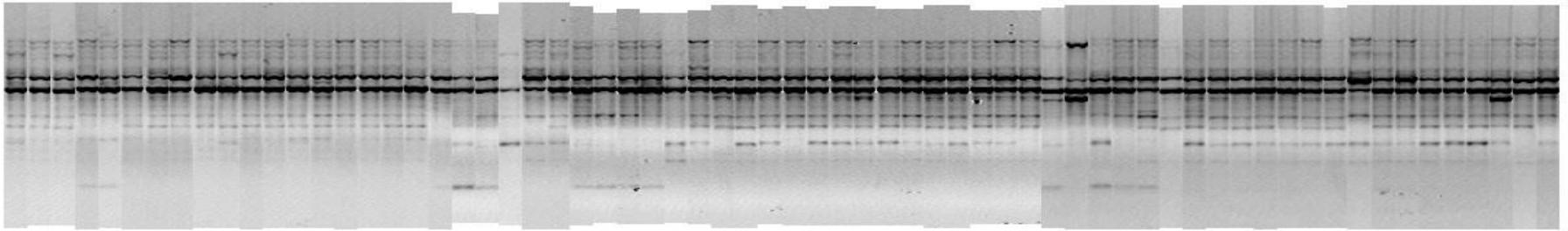
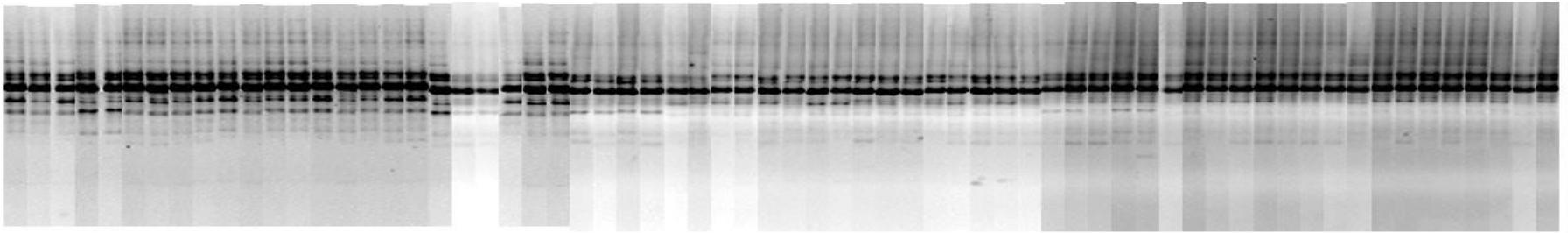
O produto da amplificação das reações de PCR foi separado em cuba vertical de eletroforese a 200V por 150 minutos em gel de agarose 1,5% e revelado com 5 μ L com brometo de etídio na concentração de 1 mg mL⁻¹, as fotos foram tiradas com aparelho transluminador UV.

Devido a problemas de contaminação de algumas reações de PCR, apenas sete primers (OPA04, OPA07, OPA19, OPD10, OPE17, OPH05 E OPP02) foram selecionados para a execução do dendrograma de similaridade genética (Figura 2).

Para construção do dendrograma de similaridade genética, as imagens dos produtos da amplificação por PCR em gel de agarose 1% corados com brometo de etídeo, foram ajustadas e analisadas com o uso do programa Gel Compar II da Applied Maths®, de acordo com a presença ou ausência de bandas, e a similaridade genética foi determinada pelo índice de similaridade de JACCARD (1976) (Figura 3).

O dendrograma de similaridade genética dividiu-se em dois grandes grupos, sendo que o grupo um se dividiu em outros três subgrupos (1A, 1B e 1C).

Para dar continuidade à hipótese do trabalho de comparar genótipos contrastantes geneticamente, as variedades foram selecionadas de grupos isolados para os estudos de cinética de absorção, expressão dos transportadores de amônio e enzimas de assimilação.



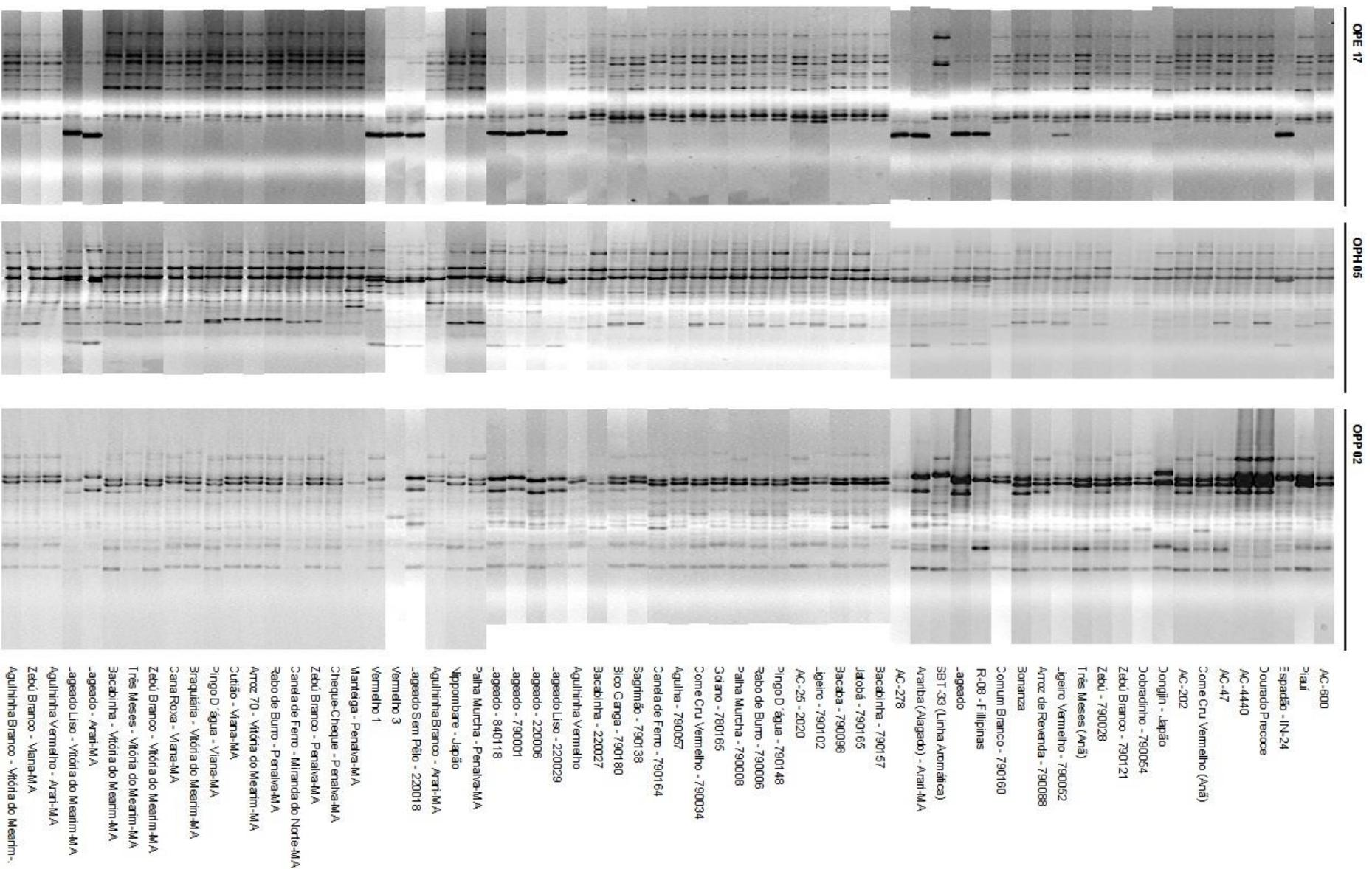


Figura 2. Produto da revelação das reações de PCR dos primers OPA04, OPA07, OPA19, OPD10, OPE17, OPH05 E OPP02 em gel de agarose 1,5% coradas com brometo de etídeo.

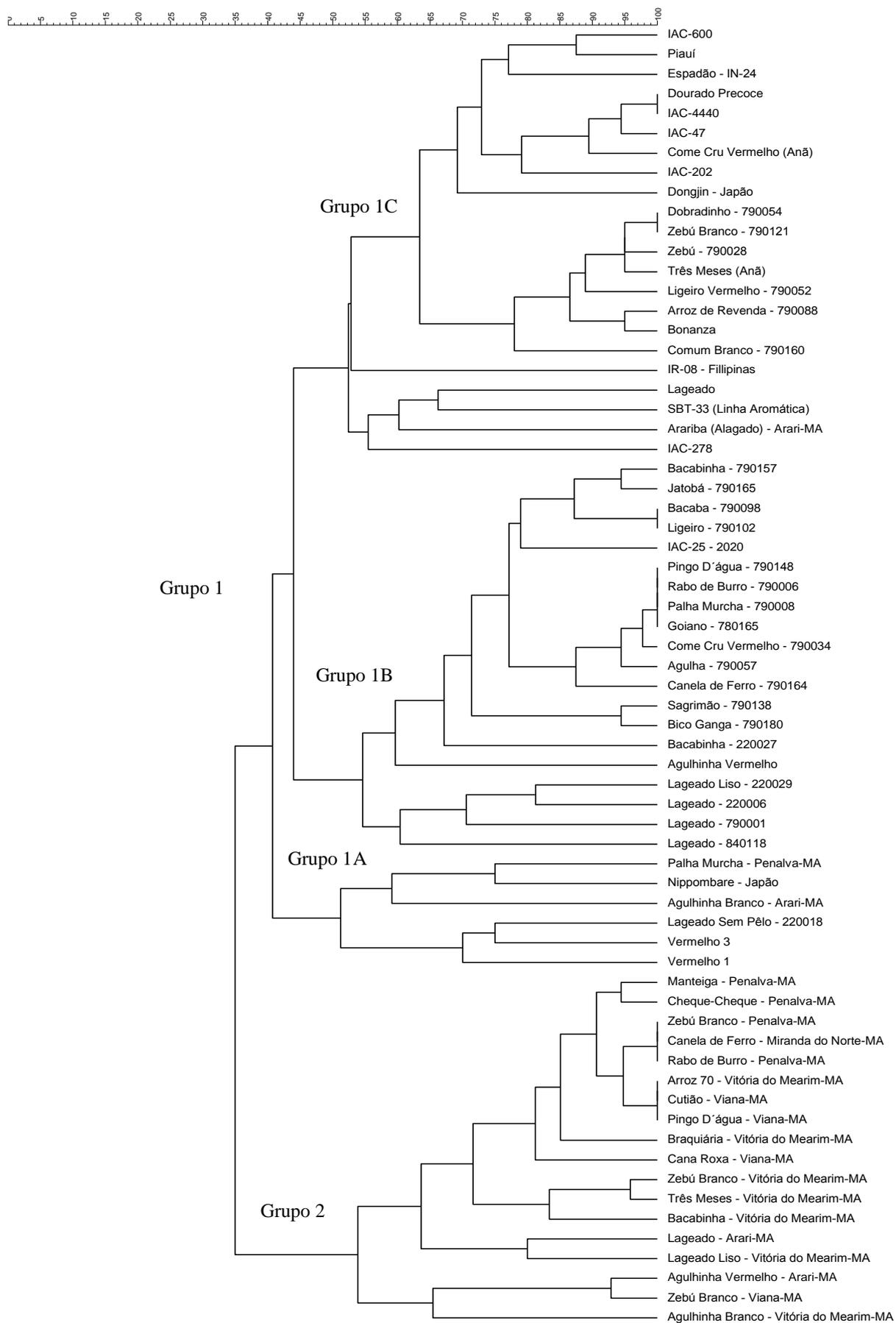


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética calculado pelo índice de Jaccard (1976) das variedades de arroz analisadas

3.2 Condução do Experimento em Câmara de Crescimento

Quatro variedades de arroz foram selecionadas com base na divergência genética através da técnica de RAPD para dar continuidade aos estudos de cinética de absorção e expressão dos transportadores de amônio, a variedade IAC-47 (melhorada) e três variedades locais, originalmente coletadas no Maranhão (Manteiga, Revenda e Bico Ganga).

Foram comparados os teores de proteína nos grãos entre as variedades quando produzidas no Maranhão e quando produzidas em estufa no campus experimental da UFRRJ (Tabela 3). Fatores ambientais e diferentes tratos culturais são as principais fontes de variação do teor de proteína nos grãos de arroz.

O teor de proteína de uma variedade de arroz pode variar cerca de sete pontos percentuais em função das condições ambientais como: intensidade luminosa, temperatura do ar, disponibilidade de água e disponibilidade de nitrogênio (CAGAMPANG et al., 1966). O aumento no teor de proteína está relacionado com a redução dos níveis de carboidratos e não com o aumento de proteína em si. (JENNER et al., 1991).

Em atividades paralelas ao trabalho de dissertação, foi executado um trabalho de construção de um dendrograma de similaridade genética (dados não concluídos) utilizando a técnica de microssatélites, em análises preliminares com o primer P22 (BONOW et al. 2009) capaz de diferenciar variedades de arroz, entre as subespécies índica e japônica. Foi possível determinar que as quatro variedades analisadas neste trabalho pertencem a subespécie japônica.

As variedades selecionadas foram cultivadas em solução nutritiva na câmara de crescimento, do Departamento de Solos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). As condições ambientais foram: fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) com luminosidade de $480 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna).

Tabela 3. Teor de proteína das variedades avaliadas. Plantas cultivadas em diferente locais (Maranhão e em estufa no campus da UFRRJ). *Araújo 2010, dados ainda não publicados.

Variedade	Acesso/ Local	Teor de Proteína no Grão	Local de produção das sementes	Fonte
Manteiga	Penalva-MA	10,48	Maranhão	Araújo et al. 2003
		5,52	Campus UFRRJ	Araújo 2010*
Revenda	790088-MA	6,68	Maranhão	Ferraz Jr. 2001
		7,22	Campus UFRRJ	Araújo 2010*
Bico Ganga	790180- MA	11,21	Maranhão	Ferraz Jr. 2001
		7,31	Campus UFRRJ	Araújo 2010*
IAC-47	IAC-SP	7,00	Maranhão	Ferraz Jr. 2001
		8,23	Campus UFRRJ	Araújo 2010*

Sementes de cada variedade foram tratadas com hipoclorito de sódio 2-3% por 15 minutos e posteriormente lavadas com água destilada em abundância até eliminar qualquer resíduo restante de hipoclorito de sódio. Após o tratamento das sementes, estas foram colocadas para germinar em potes de 3 L de água destilada e cobertos por uma dupla camada

de gaze para impedir a imersão das sementes. Uma semana após a germinação, as plântulas foram transferidas para potes de 0,7 L, quatro plantas por pote, contendo uma solução nutritiva basal de crescimento de HOAGLAND e ARNON (1950) modificada com 0,2 mM de N-NH_4^+ e a ¼ de força iônica para os demais nutrientes. Quatro dias após a transferência para os potes, a solução nutritiva basal de crescimento foi trocada por uma a ½ força iônica até os 28 DAG. A solução nutritiva foi trocada a cada dois dias, e o pH foi corrigido para 6,0 com H_2SO_4 .

Aos 28 DAG, a solução nutritiva foi trocada para uma solução sem nitrogênio por 24 horas e em seguida os potes foram separados em dois grupos e cada grupo separado em mais dois sub grupos.

O primeiro grupo foi dividido em outros dois grupos que receberam 0,2 M de N-NH_4^+ (HATS) e 1,5 mM de N-NH_4^+ (LATS), duas horas após o início do período luminoso, e foram separados para o experimento de cinética de depleção de amônio. Amostras da solução nutritiva foram coletadas a cada meia hora para a concentração de 0,2 mM de N-NH_4^+ e a cada duas horas para a concentração de 1,5 mM de N-NH_4^+ afim de determinar os parâmetros cinéticos de cada variedade. Foram coletados 1,5 mL de solução por coleta em tubos ependoff e o conteúdo de amônio foi determinado pelo método de FELKER (1977). Não foi realizado a cinética de depleção de amônio no sistema LATS para a variedade Manteiga, devido ao baixo vigor na germinação das sementes. Após o período de 24 horas, foram coletadas as plantas para a concentração de 0,2 mM de N-NH_4^+ e após 48 horas as plantas para a concentração de 1,5 mM de N-NH_4^+ . Amostras de um grama de material foram coletadas das raízes, bainha e folhas e posteriormente foram homogeneizadas em etanol 80% e fracionadas com clorofórmio (FERNANDES, 1984) e através da fração solúvel obtida foi utilizada para determinação dos teores de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH_4^+ (FELKER, 1977) e açúcares solúveis (YEMM e WILLIS, 1954).

O segundo grupo foi dividido em dois outros grupos, onde metade recebeu solução de 0,2 mmol L^{-1} de N-NH_4^+ e a outra metade não recebeu N-NH_4^+ atuando como um controle para os resultados de expressão gênica dos transportadores OsAMT1s e as enzimas GS1.2 e NADH-GOGAT1, essas plantas foram coletadas em dois tempos distintos, duas e quatro horas após a troca da solução, para análise dos parâmetros de expressão entre as variedades com os tempos estudados.

Para determinação do $\text{C}_{\text{mín}}$, 1,0 mL da solução nutritiva foi coletado após 24 horas do início do experimento e concentrado em Concentrador Ependoff® à temperatura de 45°C até toda água contida na solução evaporar. Posteriormente, o concentrado final foi novamente suspenso em 200 μL de água milliQ e determinada a concentração de amônio pelo método de FELKER (1977).

Para determinação dos demais parâmetros cinéticos, foi utilizado o programa cinética 1.0 (RUIZ et al., 1992) que se baseia no método proposto por CLAASSEN e BARBER (1974), onde o melhor ajuste entre as variedades foi escolhido e adotado para todas.

3.3 Extração de RNA Total

O procedimento para extração do RNA total foi realizado segundo GAO et al. (2001) mantendo as amostras sobre gelo e as centrifugações sob a temperatura de 4 °C. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até serem completamente pulverizadas e homogeneizadas. Uma fração de tecido foi coletada em microtubos de 2 mL, preenchendo até a metade do microtubo de tecido vegetal e adicionados 1000 μL de tampão de extração NTES_{DEPC}, composto de 200 mM Tris-Cl, pH 8,0; 25 mM EDTA; 300 mM de NaCl e 2% de SDS. Depois de misturadas, amostras e tampão de extração, foram adicionados 350 μL de fenol e 350 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A mistura foi agitada em vórtex durante 10 minuto e em seguida centrifugadas por 20 minutos a 18.000g. Da fase aquosa

foram transferidos 700 μL para novos tubos e após este procedimento o RNA foi precipitado com 1/10 volume de $\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$ 2 M pH 4,8 e 1 volume de isopropanol. Em seguida, as amostras foram acondicionadas em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 1,0 mL de $\text{EtOH}_{\text{DEPC}}$ 70% gelado e novamente centrifugado a 12.000x g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet ressuspensionado com 750 μl de água milliQ_{DEPC}. Após completa dissolução do pellet, foram adicionados 750 μl de $\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$ 4 M para precipitação do RNA. Estas amostras foram mantidas em repouso em geladeira durante a noite e então centrifugada por 20 minutos a 12.000g na manhã seguinte. O pellet foi novamente ressuspensionado em 450 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e 50 μl de $\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$ 2 M pH 4,8 e posteriormente, foram adicionados 1000 μl de EtOH absoluto gelado ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a mistura foi novamente acondicionada em freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Após esse período foi realizado uma nova centrifugação a 12.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet lavado com 500 μL de $\text{EtOH}_{\text{DEPC}}$ 70%. Após a secagem do pellet o RNA foi ressuspensionado em 30 μL de água milliQ_{DEPC} e armazenado no freezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4 Tratamento com DNase I e Síntese do cDNA

O RNA total foi quantificado no Thermo Scientific NanoDrop 2000c e após a quantificação, foram corridas amostras de cada extração em gel de agarose 1% para detecção de possíveis sinais de degradação e contaminação com DNA. (Figuras 4 e 5).

Como as amostras apresentaram padrões semelhantes de qualidade de RNA extraído e pouca contaminação por DNA, as três repetições escolhidas para as análises foram selecionadas com base nas concentrações determinadas durante a quantificação, sendo escolhidas as amostras que apresentaram concentrações próximas a $0,6\text{ }\mu\text{g }\mu\text{L}^{-1}$ de RNA.

RNA total extraído de cada amostra foi diluído de forma que todas as amostras ficassem com a concentração final de $0,5\text{ }\mu\text{g}$ em $5\mu\text{L}$ e foram tratados com DNase (DNase I Amplification Grade – SIGMA®), seguindo instruções do fabricante. A incubação da reação foi conduzida a 25°C por 15 minutos, seguida da adição de $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de EDTA 25 mM para evitar a hidrólise do RNA e posterior inativação da DNase I a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. A reação de síntese do cDNA foi realizada com o kit “TaqMan® Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystem®) seguindo instruções do fabricante como mostrado na Tabela 4.

A reação de síntese do cDNA foi conduzida a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos seguido de uma segunda etapa de 120 minutos a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e sendo finalizada com 5 segundos a 85°C

Tabela 4. Reação de Síntese do cDNA utilizando o kit TaqMan® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystem®).

Componentes	Volume (μL)
2x RT Buffer	1,0
2x dNTP Mix (100 mM)	0,4
2x RT Random Primers	1,0
MultiScribe™	0,5
Reverse Transcriptase	0,5
RNase Inhibitor	0,5
Nuclease-free H2O	1,6
Amostra	0,5
Total por Reação	5,5

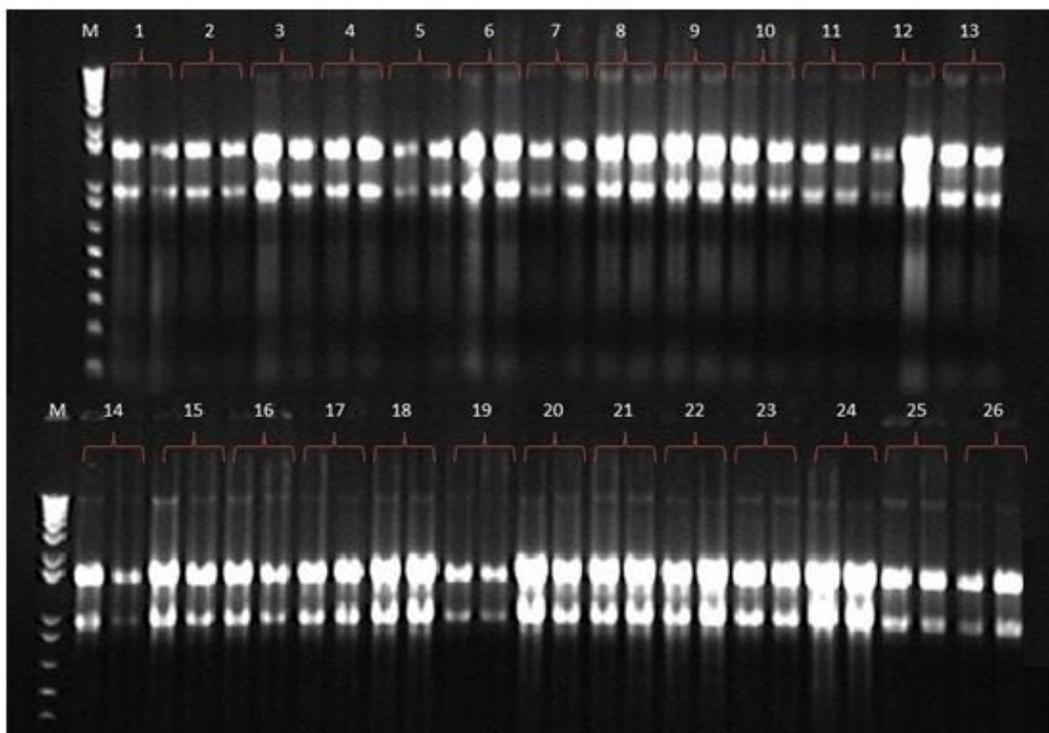


Figura 4. Avaliação da qualidade do RNA extraído. M – marcador 1Kbp Plus DNA Ladder Invitrogen®; 1 a 26 – amostras da extração de RNA das quatro repetições do experimento de expressão gênica extraídas em duplicatas.

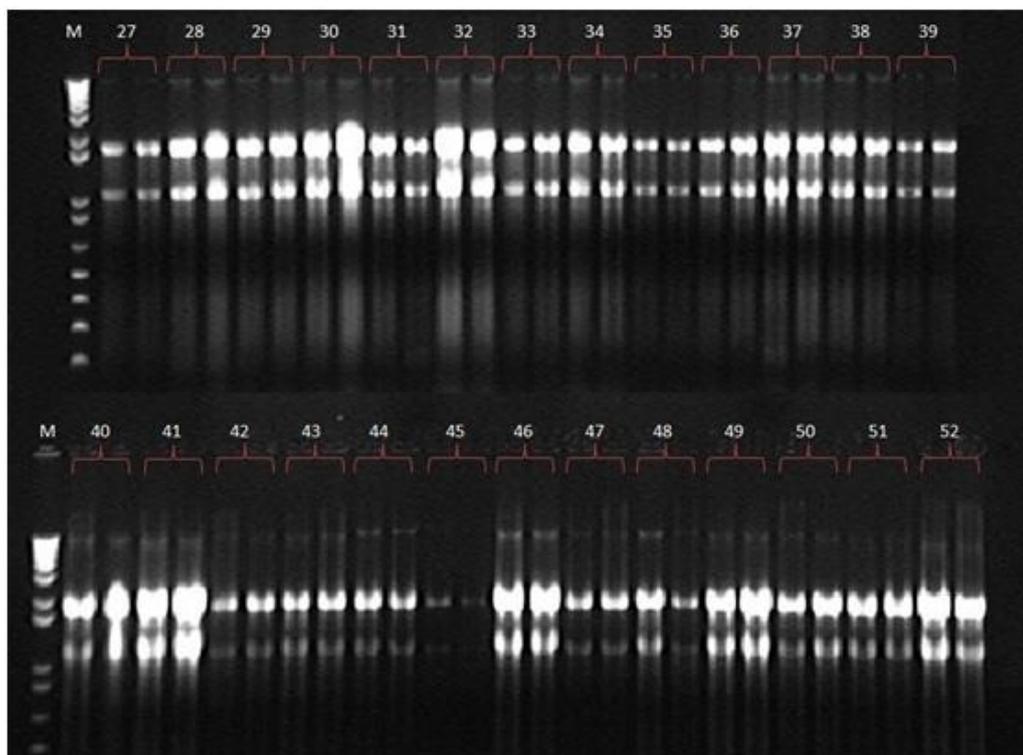


Figura 5. Avaliação da qualidade do RNA extraído. M – marcador 1Kbp Plus DNA Ladder Invitrogen®; 27 a 52 – amostras da extração de RNA das quatro repetições do experimento de expressão gênica extraídas em duplicatas.

3.5 Iniciadores e Expressão Gênica por PCR em Tempo Real

Os primers foram selecionados através de resultados obtidos com outros trabalhos, todos desenhados para o sistema real time RT-PCR (Tabela 5).

Para os genes que codificam os transportadores *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3* foram utilizados os primers desenhados por DUAN et al. (2007), já para os genes que codificam as enzimas de assimilação GS e NADH-GOGAT foram utilizados os primers desenhados por ZHAO et al. (2006).

A especificidade dos primers foi testada através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Tabela 5. Sequências dos primers utilizados nas reações de PCR em tempo real e número de acesso dos genes para busca no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Nº acesso
OsAMT1;1	5'-CGTGCCGTGTCAGGTCCAT-3'	5'-GGTCATCTTCGGGTGGGTCA-3'	AF289477
OsAMT1;2	5'-GAAGCACATGCCGCAGACA-3'	5'-GACGCCCGACTTGAACAGC-3'	AF289478
OsAMT1;3	5'-GCGAACGCGACGGACTA-3'	5'-GACCTGTGGGACCTGCTTG-3'	AF289479
GS1.2	5'-GAGTCGTGCTCTCCCTTGAC-3'	5'-CTCATCGACTTGGTGCTGAA-3'	
OsGlt1	5'-GGAGGGAAATCTAATACAGG-3'	5'-AGTTCATCAGCGTTAGTCAG-3'	AP004363
Actin	5'-TTATGGTTGGGATGGGACA-3'	5'-AGCACGGCTTGAATAGCG-3'	NM_197297

A reação de síntese do cDNA foi diluída 5X para utilização nas reações de PCR em tempo real. O gene da *Actina* de arroz foi utilizado como padrão interno nas reações de PCR. As reações de PCR em tempo real foram feitas no aparelho StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) utilizando o kit Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems®) seguindo recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em duplicatas, para as reações de expressão dos transportadores foram utilizadas três repetições por tratamento, já para as reações de expressão das enzimas de assimilação fora utilizadas somente duas repetições. A reação foi montada em placas de PCR da seguinte forma: 6 µL do tampão Power SYBR® Green PCR Master Mix 2X, 3 µL de uma solução de primers 3,6 µM cada e 3 µL do cDNA diluído, com volume final de 12 µL. A placa foi selada com filme ótico apropriado, e foi realizada uma pré centrifugação por 30 segundo. Posteriormente, a placa foi agitada por um minutos em vórtex próprio e após repouso de 30 segundos o processo de agitação foi repedido e a operação foi finalizada com centrifugação a 4.000g por 3 min a 25 °C. A reação foi colocada no aparelho com a seguinte programação: 95 °C 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C, 15 segundos e 60 °C 1 minuto. Uma curva de dissociação (*melting curve*) foi adicionada ao programa para identificar possíveis amplificações inespecíficas. Nenhum gene estudado mostrou amplificações inespecíficas, validando todas as análises de expressão feitas neste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da Cinética de Absorção de Amônio

Os parâmetros cinéticos utilizados para a avaliação da absorção de nutrientes em plantas são: $V_{\text{máx}}$, K_M e $C_{\text{mín}}$. $V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$), que significa o máximo de transporte possível de um nutriente, quando todos os transportadores estão carregados, e quanto maior o seu valor, maior será a velocidade da planta em absorver o nutriente do solo.

O valor do K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$) representa a concentração de determinado nutriente necessária para que a absorção do nutriente atinja metade de sua $V_{\text{máx}}$. Quanto menor o valor de K_M , maior a afinidade do transportador pelo nutriente do solo.

O $C_{\text{mín}}$ ($\mu\text{mol L}^{-1}$) por sua vez é um valor de concentração do nutriente na solução do solo em que o influxo líquido é igual à zero. Quanto menor é este valor, maior é a eficiência da planta na aquisição do nutriente.

O padrão de K_M não diferiu entre as variedades para a concentração de 0,2 mM de N-NH_4^+ (Figura 6). Em parte, isso se deve a baixa concentração da solução nutritiva e a rápida absorção pelas plantas, o que terminou não sendo sensível para determinar diferenças entre as variedades. Com relação ao parâmetro $V_{\text{máx}}$, a variedade Manteiga se destacou das demais, apresentando um menor valor de $V_{\text{máx}}$.

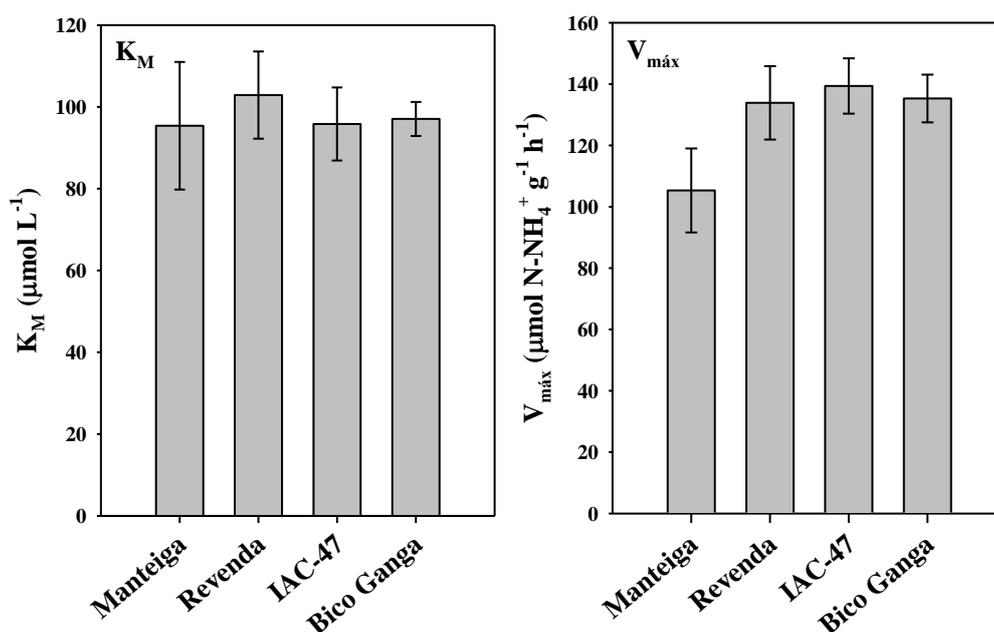


Figura 6. Valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ das variedades de arroz: Manteiga, Revenda, IAC-47 e Bico Ganga, após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo 0,2 mM de N-NH_4^+ . Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

Quando se observa o gráfico de depleção de amônio entre as variedades para a concentração de 0,2 mM de N-NH_4^+ , não se observa diferenças entre as variedades (Figura 7), em parte pela rápida absorção do amônio pelas variedades. Já quando observado a depleção na concentração de 1,5 mM de N-NH_4^+ (Figura 9) há uma sensível diferença entre as variedades após as 6 horas de coleta, onde ocorre a mudança no sistema de absorção de

amônio, de baixa para alta afinidade (LATS para HATS), confirmando a hipótese de que a menor concentração de amônio não foi sensível para diferenciar as variedades.

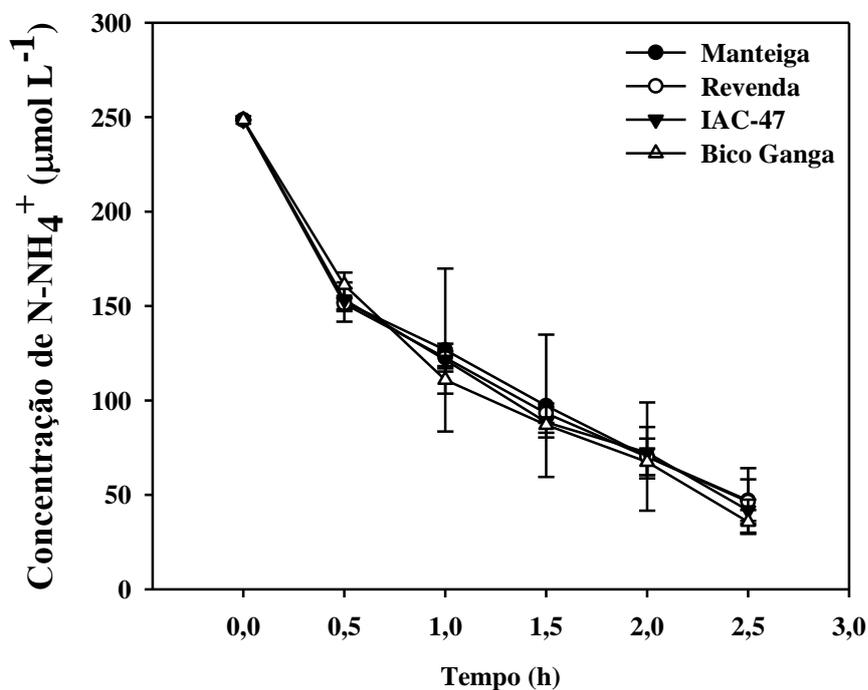


Figura 7. Depleção de $N-NH_4^+$ em quatro variedades de arroz após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo 0,20 mM de $N-NH_4^+$ após 24 horas de privação de N. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

Ao analisar os parâmetros de K_M para a concentração de 1,5 mM de $N-NH_4^+$ (Figura 8), as variedades Revenda e Bico Ganga se destacam da variedade IAC-47, indicando uma maior eficiência na absorção do amônio, fator esse esperado, já que variedades melhoradas como o caso da variedade IAC-47 foram melhoradas sob altas concentrações de insumos, tendo assim, uma menor afinidade à absorção do amônio pelas raízes.

A variedade Bico Ganga não só apresentou maior valor de $V_{m\acute{a}x}$, indicando uma maior taxa de absorção, como também o menor valor de K_M , indicando uma alta afinidade.

A capacidade diferenciada entre as variedades de desenvolver o sistema radicular pode ser interpretada como uma habilidade adaptativa para absorver nutrientes mais eficientemente (MENGEL e BARBER, 1974), o que reflete o perfil das variedades locais Manteiga, Revenda e Bico Ganga em relação a variedade melhorada IAC-47.

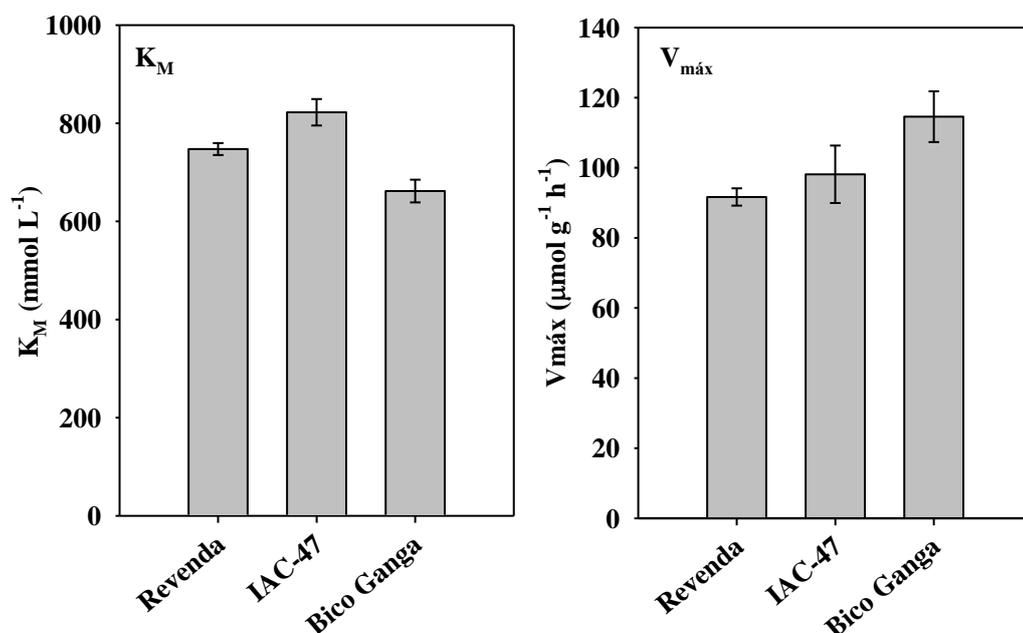


Figura 8. Valores de K_M e $V_{\text{máx}}$ das variedades de arroz: Revenda, IAC-47 e Bico Ganga, após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo 1,5 mM de N-NH_4^+ . Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

A massa de raiz observada nas variedades locais Manteiga, Revenda e Bico Ganga quando cultivadas por 24 horas com solução nutritiva contendo 0,2 mM de N-NH_4^+ foram superiores ao da variedade melhorada IAC-47 (Figura 10). Por outro lado, a massa de bainha e folhas não difere entre as variedades. Esse comportamento pode ser uma adaptação dos genótipos locais para aumentar a razão raiz / parte aérea a fim de explorar um maior volume de solo em busca de nutrientes e conseqüentemente melhorar a taxa de absorção. A variedade melhorada IAC-47 não apresenta essa característica. Diferentemente aos valores observados para o ressuprimento com a concentração de 1,5 mM de N-NH_4^+ , onde as variedades Revenda e IAC-47 apresentaram um maior investimento em sistema radicular em relação a variedade Bico Ganga

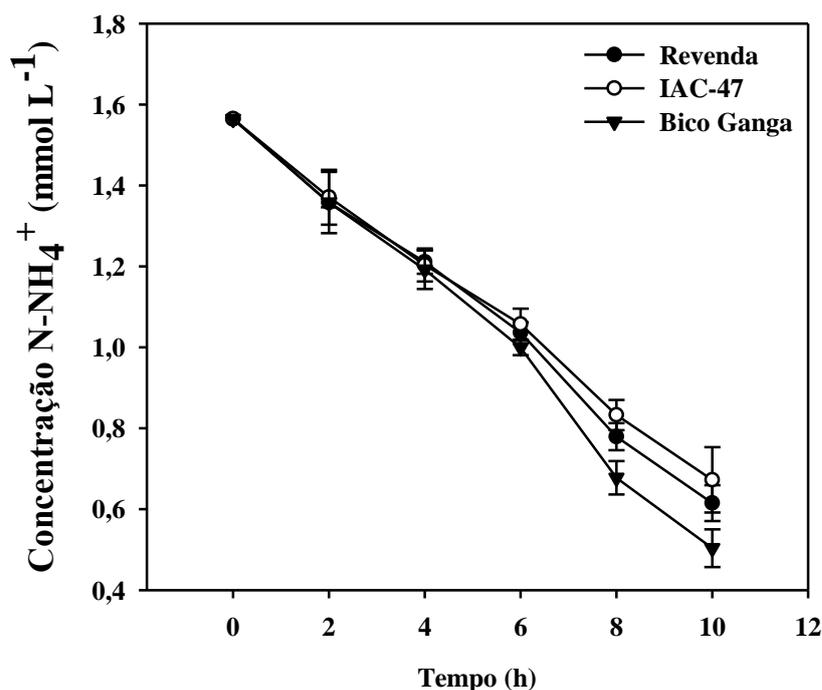


Figura 9. Depleção de N-NH_4^+ em três variedades de arroz após ressuprimento com uma solução nutritiva contendo $1,50 \text{ mM}$ de N-NH_4^+ após 24 horas de privação de N. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

Dentre os parâmetros cinéticos, o K_M é o que apresenta maior variação entre as variedades, indicando que as variedades aqui estudadas foram obtidas através de um processo adaptativo sob diferentes concentrações de nitrogênio no solo. Fato que pode ser verificado nas variedades locais, principalmente as variedades Bico Ganga e Revenda, que se diferenciaram da variedade melhorada IAC-47 na cinética de depleção de amônio (Figura 8) e tiveram um maior investimento em tecido radicular, características de variedades mais adaptadas a baixa disponibilidade de nutrientes, especialmente de N.

Os parâmetros cinéticos como K_M e $C_{\text{mín}}$ podem apresentar mais relevância na agricultura tropical, por se tratar de regiões com solos mais intemperizados e, conseqüentemente, com menores concentrações de nutrientes. Nessas regiões, chuvas intensas durante um curto período de tempo, levam a uma rápida decomposição da matéria orgânica do solo, ocasionando o que conhecemos como *flush* de nutrientes, que deve ser rapidamente aproveitado pelas plantas. Assim, plantas com maior afinidade pelo nutriente em questão, ou seja, com menor K_M podem apresentar uma vantagem. Fora destas épocas, os teores dos nutrientes no solo são geralmente muito baixos, tendo vantagens variedades que apresentam menor $C_{\text{mín}}$.

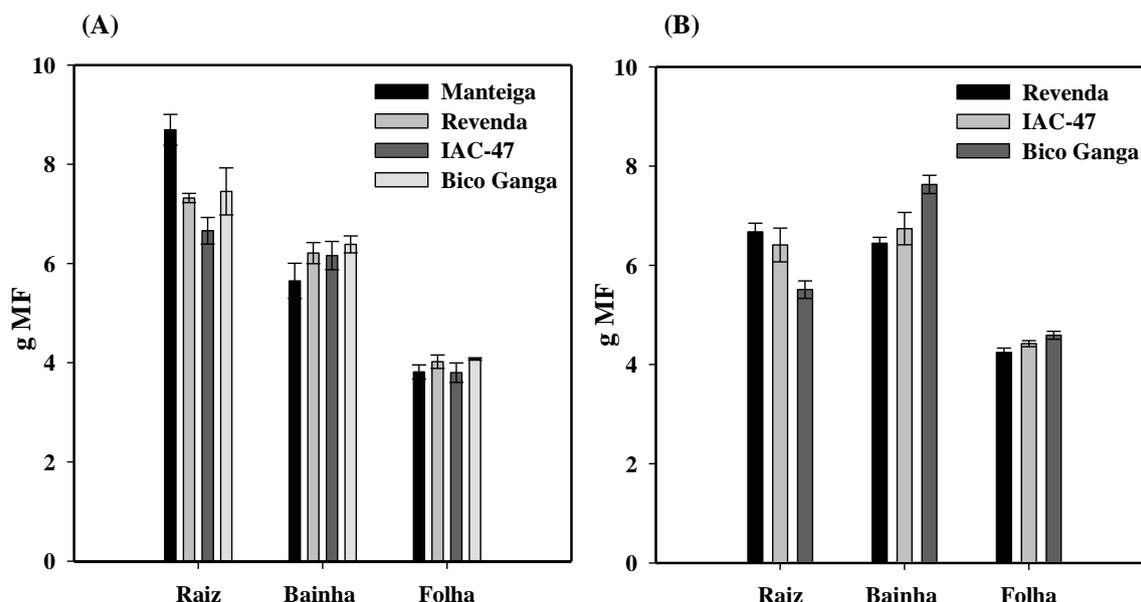


Figura 10. Massa fresca (g/vaso) de raiz, bainha e folha das quatro variedades (Manteiga, Revenda, IAC-47 e Bico Ganga) para a concentração de 0,2 mM de N-NH₄⁺. **(A)**. Massa fresca (g/vaso) de raiz, bainha e folha das três variedades (Revenda, IAC-47 e Bico Ganga) para a concentração de 1,5 mM de N-NH₄⁺. **(B)**. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

Mesmo apresentando um valor de $V_{\text{máx}}$ inferior das demais, a variedade Manteiga parece ser mais adaptada a solos pobres em N-NH₄⁺. Com menor valor de $C_{\text{mín}}$ (Figura 11), indicando uma maior adaptação a baixas concentrações de nutrientes na solução do solo, sendo capaz de absorver o N-NH₄⁺ em concentrações menores que as demais variedades.

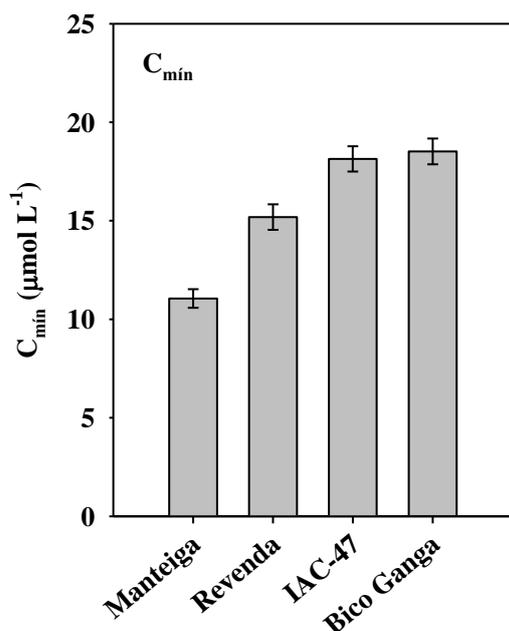


Figura 11. $C_{\text{mín}}$ para N-NH₄⁺ em quatro variedades de arroz. Os valores foram obtidos 24 horas após a adição de uma solução contendo 0,2 mM de N-NH₄⁺. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

A variedade Bico Ganga também apresentou C_{\min} superior de $N-NH_4^+$ em solução quando comprada com a variedade Agulha por Baptista (1995), o que parece ser uma característica da própria variedade de ter valores de C_{\min} maiores que as demais variedades locais estudadas.

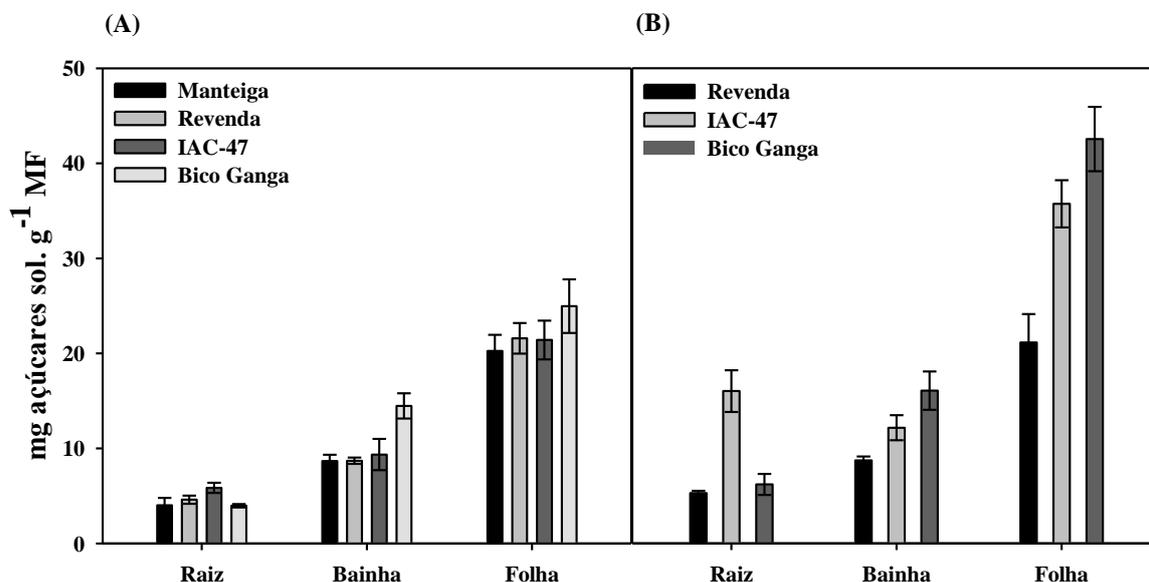


Figura 12. Teores de açúcares solúveis nas raízes bainhas e folhas de variedades de arroz submetidas a diferentes doses de $N-NH_4^+$ depois de 24 horas de privação de N. Teores de açúcares solúveis 24 horas após a adição da solução contendo 0,2 mM de $N-NH_4^+$. (A). Teores de açúcares solúveis 48 horas após a adição da solução contendo 1,5 mM de $N-NH_4^+$. (B). Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

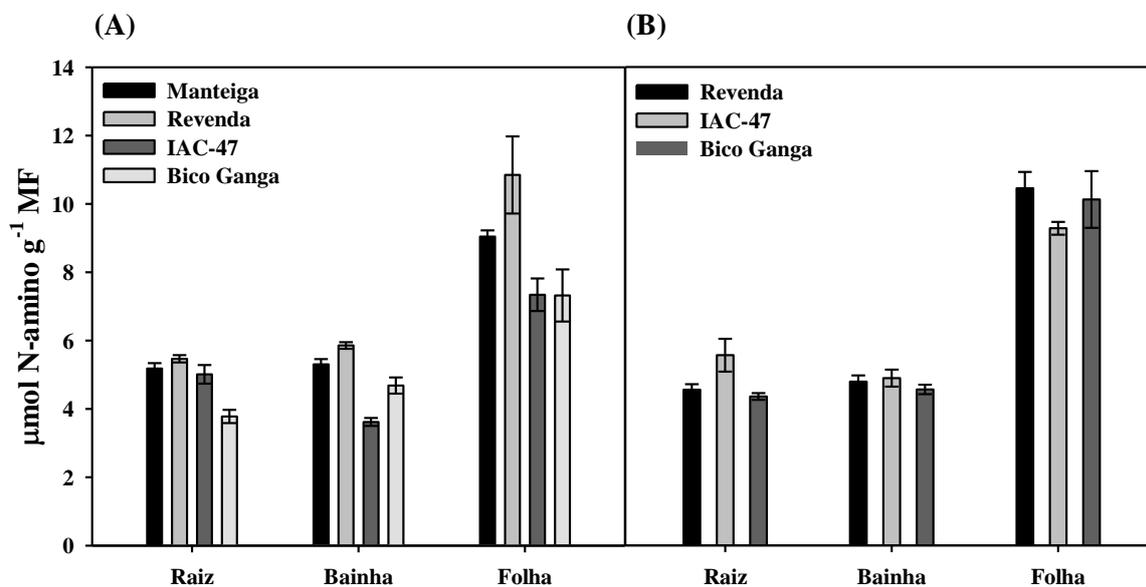


Figura 13. Teores de N-amino livre nas raízes bainhas e folhas de variedades de arroz submetidas a diferentes doses de $N-NH_4^+$ depois de 24 horas de privação de N. Teores de N-amino 24 horas após a adição da solução contendo 0,2 mM de $N-NH_4^+$. (A). Teores de N-amino 48 horas após a adição da solução contendo 1,5 mM de $N-NH_4^+$. (B). Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

Outro ponto importante é o menor acúmulo de amônio no tecido radicular da variedade Manteiga (Figura 14). Aparentemente, o amônio absorvido está sendo rapidamente assimilado em esqueletos de carbono e sendo transportado na forma de aminoácidos, predominantemente na forma de glutamina, para a parte aérea da planta e, em principal, para as folhas, onde atua como matéria prima para a síntese de outros aminoácidos e outras moléculas como proteínas, enzimas e ácidos nucléicos.

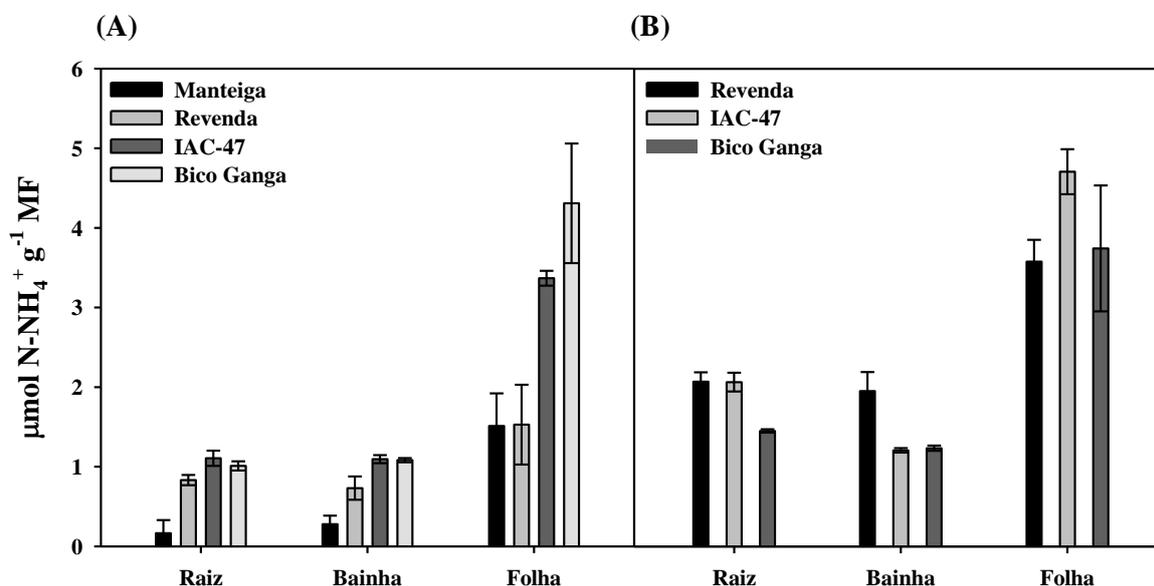


Figura 14. Teores de $N-NH_4^+$ nas raízes bainhas e folhas de variedades de arroz submetidas a diferentes doses de $N-NH_4^+$ depois de 24 horas de privação de N. Teores de $N-NH_4^+$ 24 horas após a adição da solução contendo 0,2 mM de $N-NH_4^+$. **(A)**. Teores de $N-NH_4^+$ 48 horas após a adição da solução contendo 1,5 mM de $N-NH_4^+$. **(B)**. Barras representam o erro padrão da média entre 4 repetições.

Estudos recentes tentando explicar a toxidez pela assimilação de NH_4^+ por algumas variedades, fato esse ainda pouco esclarecido, geraram diversas propostas para explicar esse fenômeno. A absorção de NH_4^+ , bem como a liberação de H^+ na incorporação NH_4^+ em esqueletos de carbono são acompanhados pela extrusão de H^+ pelas raízes. Tem sido repetidamente sugerido que a acidificação do meio apoplástico e conseqüentemente da solução nutritiva, é reflexo de um desbalanço de cargas no citosol decorrente do influxo de amônio, e que este influxo é dependente de um potencial de membrana previamente existente em cada variedade ou espécie vegetal, resultando em maior ou menor tolerância ao NH_4^+ . Geralmente, plantas que conseguem manter um menor potencial de membrana frente a altos níveis de NH_4^+ na solução, são mais tolerantes a esse íon. Outros autores têm sugerido que a limitação de carboidratos pode contribuir para a síndrome de toxicidade, por alterar a relação C/N nas raízes, com base na constatação de que NH_4^+ , por si só não é translocado para a parte aérea na maioria das plantas (KRONZUCKER et al, 1998). Outro fator estaria relacionado com a dificuldade das raízes em absorver outros cátions essenciais, como Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^+ , quando expostas a concentrações de NH_4^+ por longos períodos. Assim, variedades que possuem a capacidade de rapidamente absorver o NH_4^+ em solução, ou seja, menor K_M associada a rápida assimilação pela ação das enzimas do ciclo GS/GOGAT, apresentam vantagem para a agricultura tropical. Este perfil pode ser observado quando comparados os fatores que conferem essa adaptação entre as variedades locais do Maranhão estudadas (Manteiga, Revenda e Bico Ganga), em relação a variedade melhorara (IAC-47).

4.2 Estudo dos Transportadores de Amônio e Enzimas Relacionadas a Absorção

A absorção de NH_4^+ pelas raízes de arroz se dá através da ação de transportadores de NH_4^+ (OsAMTs), principalmente em solos alagados.

Para avaliar a diferença entre a expressão dos transportadores de amônio *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3*, entre as variedades estudadas foram estabelecidas 2 momentos distintos para avaliação, o primeiro, duas horas após o ressurgimento com 0,2 mM N- NH_4^+ , onde ocorre o momento de máxima resposta ao ressurgimento com base nos dados obtidos por SONODA (2003a) e o segundo momento, quatro horas após o ressurgimento com NH_4^+ para avaliar a tendência de manter altos níveis de expressão de cada variedade.

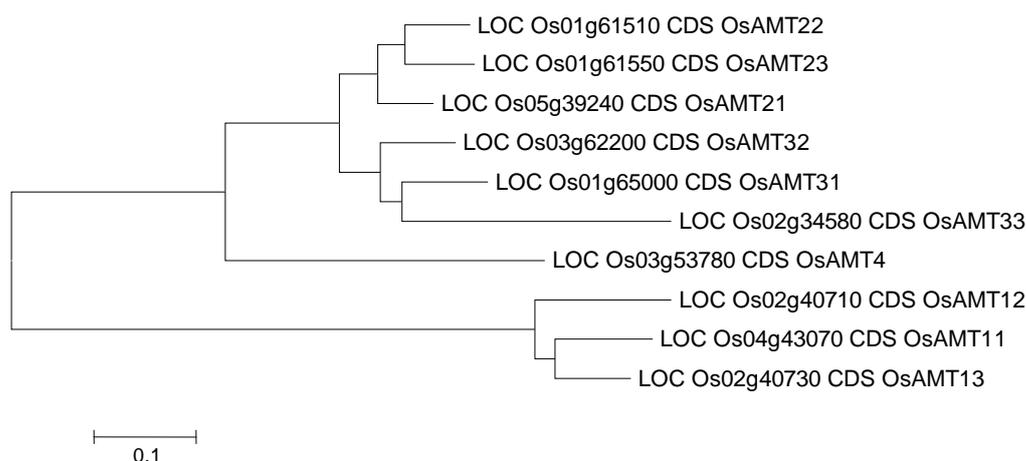


Figura 15. Árvore de similaridade genética baseada nas regiões codantes (CDS) do mRNA dos transportadores de amônio em arroz calculado por Neighbor-Joining. (Saitou e Nei, 1987)

O período de 24 horas de deficiência que antecedeu o ressurgimento de NH_4^+ para as variedades estudadas visa reduzir os níveis de NH_4^+ e de N-amino nas raízes, SONODA et al. (2003) determinou que a regulação dos transportadores de alta afinidade de NH_4^+ (*OsAMT1*) estão relacionados aos teores internos de N-amino nos tecidos radiculares e não com a concentração de NH_4^+ na solução do solo.

A expressão dos transportadores de NH_4^+ de alta afinidade é sensível a concentrações muito baixas, tendo forte indução em concentrações entre 0,2 e 0,3 mM de nitrogênio na forma amoniacal (SONODA et al., 2003b). De acordo com KUMAR et al. (2003) os três transportadores de alta afinidade em arroz respondem de forma expressiva quando as plantas são cultivadas em concentrações de 10 μM de N- NH_4^+ , reduzindo os níveis de expressão quando transferidas para uma solução de 10mM de N- NH_4^+ .

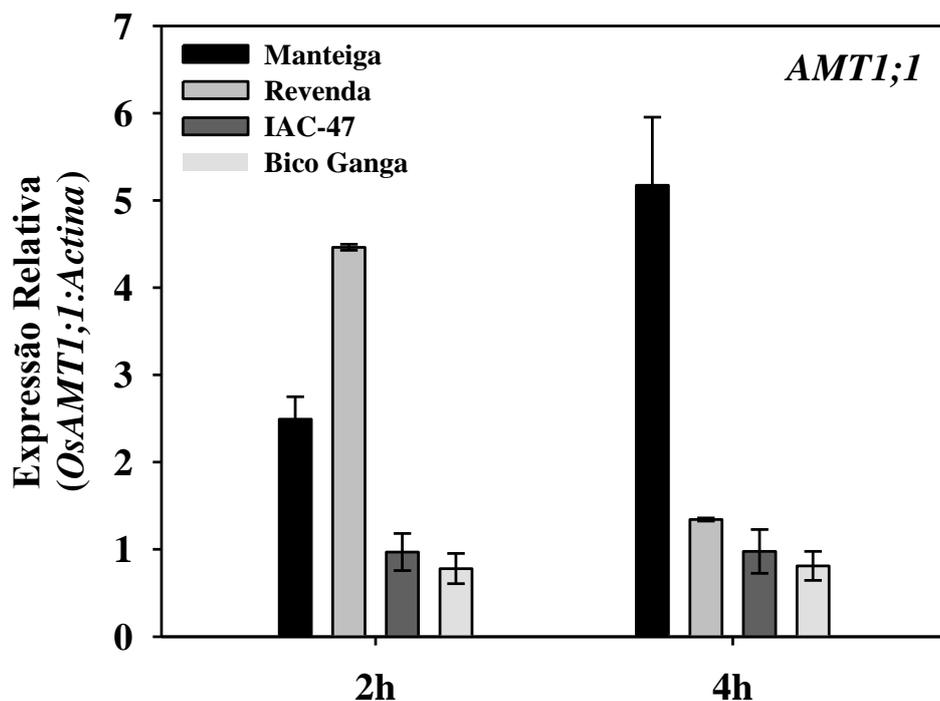


Figura 16. Expressão gênica do transportador de NH_4^+ *OsAMT1;1* nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (locais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições.

As 2h, momento de máxima indução de expressão em resposta ao ressuprimento de NH_4^+ para a cultura de arroz (SONODA et al., 2003), as variedades Manteiga e Revenda apresentaram maiores níveis de expressão do *OsAMT1;1* (Figura 16), sendo que a variedade Revenda teve uma indução de aproximadamente duas vezes maior que a indução da variedade Manteiga, já as variedades IAC-47 e Bico Ganga não apresentaram aumento de indução da expressão do transportador *OsAMT1;1*. O transportador *OsAMT1;1* é o membro dos transportadores de alta afinidade que mais contribui para absorção de amônio em plantas de arroz. Além disso, a variedade Manteiga mantém níveis elevados de expressão mesmo as 4h após o ressuprimento, praticamente dobrando sua indução as duas horas, fato que não ocorreu com as demais variedades, o que pode explicar, ao menos em parte, o seu menor C_{\min} entre as variedades estudadas.

O transportador *OsAMT1;2* possui dois papéis distintos. Dar suporte ao transportador *OsAMT1;1*, quando a concentração de NH_4^+ no meio externo está elevada e atuar como transportador, célula a célula, de NH_4^+ (TABUCHI et al. 2007). Esse relato está de acordo com os resultados encontrados para as variedades estudadas, onde os dados da expressão para o *OsAMT1;1* guarda proporções lógicas com a expressão do *OsAMT1;2*, para os dois momentos analisados. Este fato está relacionado com a menor concentração de NH_4^+ nas raízes e na solução nutritiva da variedade Manteiga, indicando não está apenas relacionado ao NH_4^+ absorvido da solução do solo, mas também com a rápida exportação célula a célula. Esse comportamento também é válido para a variedade Revenda, guardada as devidas proporções (Figura 17).

Suportando a hipótese de que a variedade Manteiga é mais eficiente na absorção de NH_4^+ entre as variedades estudadas, e que parte desse comportamento pode ser decorrente da manutenção de menores níveis de N-NH_4^+ em seus tecidos, está o fato desta variedade também apresentar maiores níveis de expressão das enzimas de assimilação GS1.2 e NADH-GOGAT1 (Figura 20). É interessante notar, que este comportamento não se reflete em

maiores teores de N-amino acumulado nos tecidos radiculares e das bainhas. Apenas uma pequena diferença pode ser observada nas folhas, mas ainda assim com menores níveis que a variedade Revenda (Figura 13).

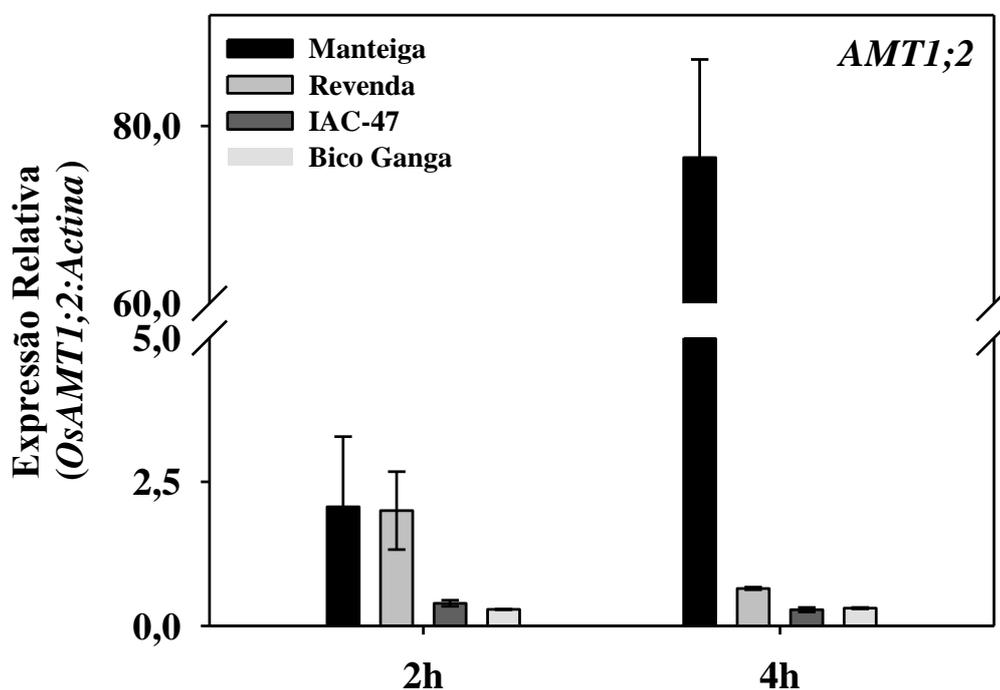


Figura 17. Expressão gênica do transportador de NH_4^+ *OsAMT1;2* nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (tradicionais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições.

Verificando a contribuição do transportador *AtAMT1;3* na absorção de amônio pelas raízes mutantes de *Arabidopsis t.* (knockout, inserção T-DNA), LOQUÉ et al. (2006) verificaram uma redução da absorção do amônio em aproximadamente 30%, quando em solução com concentração na faixa micromolar, já quando analisado em solução com concentração na faixa milimolar não houve redução do influxo de amônio em relação a variedade selvagem. Os mesmos resultados foram obtidos para do transportador *AtAMT1;1* (KAISER et al., 2002). Quando avaliado a absorção de um mutante duplo para os transportadores *AtAMT1;1* e *AtAMT1;3* foi constatado um decréscimo de 70% no influxo de amônio.

Em experimentos com arroz, KUMAR et al.(2003) transferindo plantas de uma solução com concentração de 10 mM para uma de 10 μM de N-NH_4^+ , observaram aumentos da expressão dos transportadores *OsAMT1;1*, *OsAMT1;2* e *OsAMT1;3*, sendo a maior resposta observada pelo transportador *OsAMT1;1*, seguido do *OsAMT1;2*. Curiosamente os níveis do transportador *OsAMT1;3* aumentaram durante o final do período diurno, podendo este estar ligado ao nível de carboidratos interno da planta. Este fenômeno evidencia a idéia de que os transportadores de amônio possuem papéis distintos.

Tanto a variedade Manteiga quanto a variedade Revenda, apresentaram elevada expressão do transportador *OsAMT1;3* (Figura 18) em relação as demais variedades, o que pode estar relacionado com os menores valores de $C_{\text{mín}}$ apresentado por estas em relação às demais. Isso se deve ao fato do transportador *OsAMT1;3* atuar na absorção de N-NH_4^+ em suporte ao *OsAMT1;1* quando a concentração de N-NH_4^+ disponível na solução encontra-se muito baixa, dados semelhantes foram encontrados por SONODA et al. (2003a).

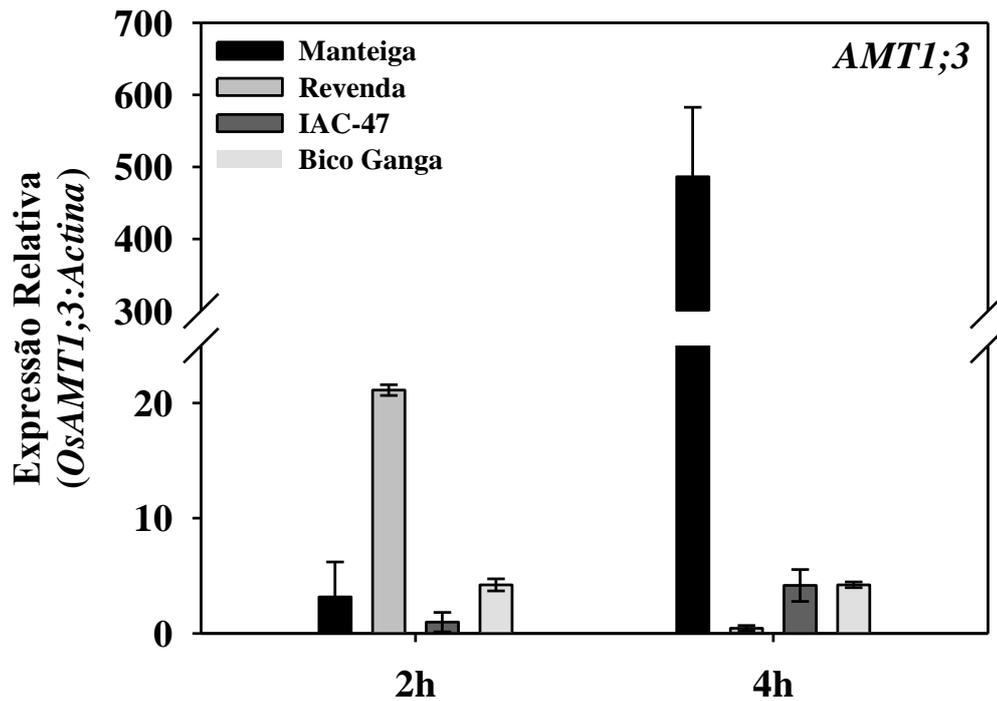


Figura 18. Expressão gênica do transportador de NH_4^+ *OsAMT1;3* nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (locais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições.

A expressão do gene *OsGS1.2* é detectado em toda parte da planta, porém apresenta uma alta expressão em raízes 3-5 horas após o ressuprimento com NH_4^+ na fase vegetativa, estando aparentemente ligado a assimilação do NH_4^+ absorvido nas raízes dando suporte a GS1.1 (ISHIYAMA et al., 2004) e apresentam propriedades cinéticas classificadas como de alta afinidade (TABUCHI et al. 2005).

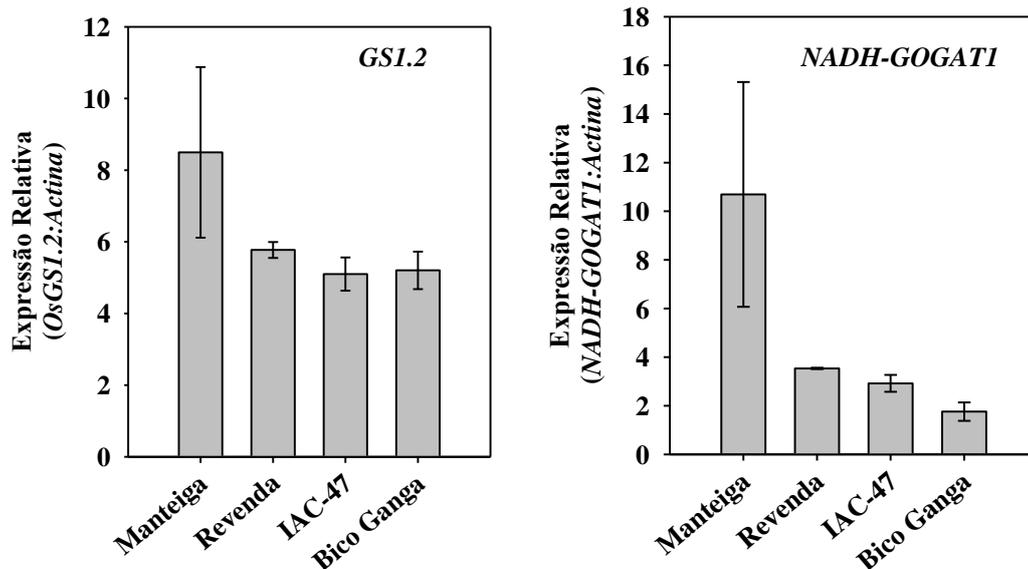


Figura 19. Expressão gênica da enzimas de assimilação de NH_4^+ GS e GOGAT, isoformas GS1.2 e NADH-GOGAT1 nas variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (locais) e na variedade IAC-47 (melhorada). Barras representam o erro padrão da média entre 3 repetições.

Avaliando a atividade das enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de alta e baixa EUN, sob baixa disponibilidade de N-NH_4^+ SHIN et al. (2010) verificaram que não houve diferenças significativas quando avaliado em parte aérea. Entretanto, quando avaliado a atividades das enzimas em sistema radicular, as atividades da GS e NADH-GOGAT tiveram um aumento de 20-30% quando comparadas entre as variedades, sugerindo que as enzimas de assimilação GS e NADH-GOGAT possuem um importante papel na assimilação do nitrogênio absorvido sob baixas concentrações de nitrogênio em solução. Em conclusão aos seus resultados, SHIN et al. (2010) verificaram que GS, NADH-GOGAT e *OsAMT1;1* são os elementos mais importantes na aquisição de nitrogênio de plantas jovens de arroz sob baixa disponibilidade de amônio quando comparado entre variedades de alta e baixa EUN, corroborando com os valores observados entre as variedades Manteiga, Revenda e Bico Ganga (locais) e a variedade IAC-47 (melhorada) para os dados apresentados.

5. CONCLUSÕES

As variedades locais, Manteiga e Revenda, apresentaram maiores níveis de expressão dos transportadores de amônio de alta afinidade, mostrando-se mais adaptadas a condições de baixa concentração de amônio.

A variedade local Manteiga apresentou os maiores níveis de expressão dos transportadores estudados, tanto para as 2 horas após a indução, quanto para as 4 horas após a indução.

A variedade local Manteiga apresentou os maiores níveis de expressão para as enzimas de assimilação GS1.2 e NADH-GOGAT1.

Os parâmetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$, K_M e $C_{m\acute{i}n}$ encontrados corroboram com os níveis de expressão dos transportadores de amônio para as variedades estudadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, M.; LEA, P. J.; RAVEN, J. A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Analytical Applied Biology**, v.154, p.25-40, 2004.

ANDREWS, M.; RAVEN, J. A.; SPRENT, J. I. Environmental effects of dry matter partitioning between shoot and root of crop plants: relations with growth and shoot protein concentration. **Annals of Applied Biology**, v.138, p.57-68, 2001.

ARAÚJO, E. S.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S.. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 11, p. 1281-1288, 2003.

BAPTISTA J. A., FERNADES M. S., SOUZA S. R. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular das cultivares de arroz agulha e bico ganga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.7, p.1325-1330, 2000.

BAPTISTA J.A. Cinetica de absorção de amônio efluxo de prótons e partição de N em arroz. Tese Mestrado. **UFRRJ**, 1995.

BAPTISTA J.A. Estudo da caracterização genética usando marcadores moleculares RAPD e eficiência de aquisição de N em genótipos de arroz (*Oryza sativa L.*). Tese (Doutorado em Agronomia (Ciências do Solo) - **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 2002.

BHUYAN, N; BORAH, B. K ; SARMA, R. N.Genetic diversity analysis in traditional lowland rice (*Oryza sativa L.*) of Assam using RAPD and ISSR markers. **Current Science**, v. 93, n. 7, p. 967-972, 2007.

BONOW, S., VON PINHO E. V.R., VIEIRA M. G. C., VOSMAN B. Microsatellite Markers in and around Rice Genes: Applications in Variety Identification and DUS Testing. **Crop Science**, v.49, p.880-886, 2009.

CAGAMPANG, G. B., CRUZ, L. T., ESPIRITU, S. G, JULIANO, B. O. Studies on the extraction and composition of Rice proteins. **Cereal Chemistry**, v.45 p.225-235, 1966.

CASTLE, L. A.; WU, G.; MCELROY, D. Agricultural input traits: past, present and future. **Current Opinion on Biotechnology**, v.17, p.105–112, 2006.

CHICHKOVA, S.; ARELLANO, J.; VANCE, C. P.; HERNANDEZ, G. Transgenic tobacco plants that overexpress alfalfa NADH-glutamate synthase have higher carbon and nitrogen content. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.2079-2087, 2001.

CLAASSEN, N.; BARBER, S.A. A method for characterizing the relation between nutrient and concentration and flux into roots of intact plant. **Plant Physiology**, v.54, p.564-568, 1974.

DUAN Y. H., ZHANG Y. L., YE L. T., FAN X. R., XU G. H., SHEN Q. R. Responses of Rice Cultivars with Different Nitrogen Use Efficiency to Partial Nitrate Nutrition. **Annals of Botany**, v.99, p.1153–1160, 2007.

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

FAO. International year of rice 2004: Rice and nutrition. Disponível em: <http://www.fao.org/rice2004/es/rice2.htm>.

FARN DEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. Ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, 1980.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, 1980, 1977.

FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.

FERRARIO-MERY, S.; VALADIER, M.-H.; GODEFROY, N.; MIALLIER, D.; HIREL, B.; FOYER C. H.; SUZUKI, A. Diurnal changes in ammonia assimilation in transformed tobacco plants expressing ferredoxin-dependent glutamate synthase mRNA in the antisense orientation. **Plant Science**, v.163, n.1, p.59-67, 2002.

FERRAZ JUNIOR, A.S.L; SOUZA S.R; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES M.S. Crude protein in rice grown in different environmental conditions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.7, n.2, p.149-157, 2001.

FERREIRA, M. E & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. **EMBRAPA – CENARGEN**, 1998.

FUENTES, S. I.; ALLEN, D. J.; ORTIZ-LOPEZ, A.; HERNÁNDEZ, G. Over-expression of cytosolic glutamine synthetase increases photosynthesis and growth at low nitrogen concentrations. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.358, p.1071-1081, 2001.

GAZZARRINI, S., LEJAY, L., GOJON, A., NINNEMANN, O., FROMMER, W.B. AND Von WIRE´ N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and

starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. **Plant Cell**, v.11, p.937-947, 1999.

GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. **Plant Molecular Biology Reporter**, 19:185-185, 2001.

GLASS A. D. M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.22, p.453-470, 2003.

GLASS A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N.; KINGHORN, J. R.; KRONZUCKER, H. J.; KUMAR, A.; OKAMOTO, M.; RAWAT, S.; SIDDIQI, M. Y.; UNKLES, S. E.; VIDMAR, J. J. The regulation of nitrate and ammonium transport system in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.855-864, 2002.

GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trends in Plant Science**, v.9, n.12, p.597-605, 2004.

HABASH, D. Z.; MASSIAH, A. J.; RONG, H. L.; WALLSGROVE, R. M.; LEIGH, R. A. The role of cytosolic glutamine synthetase in wheat. **Annals of Applied Biology**, v.138, n.1, p.83-89, 2001.

HARRISON, J.; CRESCENZO, M.-A. P. DE; SENÉ, O.; HIREL, B. Does Lowering Glutamine Synthetase Activity in Nodules Modify Nitrogen Metabolism and Growth of *Lotus japonicus*? **Plant Physiology**, v.133, p.253-262, 2003.

HIREL, B.; LEA, P. J. Photosynthetic Nitrogen Assimilation and Associated Carbon and Respiratory Metabolism, (eds. FOYER, C. H.; NOCTOR, G.). The biochemistry, molecular biology and genetic manipulation of primary ammonia assimilation, **Kluwer Academic**, p.71-92, 2002.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Stn. Bull**, v.347, p.1-32, 1950.

HOQUE, M. S.; MASLE, J.; UDVARDI, M. K.; RYAN, P. R.; UPADHYAYA, N. M. Over-expression of the rice OsAMT1-1 gene increases ammonium uptake and content, but impairs growth and development of plants under high ammonium nutrition. **Functional Plant Biology**, v.33, p.153-163, 2006.

ISHIYAMA, K.; KOJIMA, S.; TAKAHASHI, H.; HAYAKAWA, T. YAMAYA, T. Cell type distinct accumulation of mRNA and protein for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to the supply of NH_4^+ . **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.643-647, 2003.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin Société Vaudoise Science Nature**, v.3, n.7, p.547-579, 1976.

JENNER, C. F., UGALDE, T. D., ASPINAL, D. The physiology of starch and protein deposition in the endosperm of wheat. **Journal Plant Physiology**, v.18 p.211-226, 1991.

KAISER, B. N.; RAWAT, S. R.; SIDDIQI, M. Y.; MASLE, J.; GLASS, A. D. M. Functional analysis of an Arabidopsis T-DNA 'Knockout' of the high-affinity NH_4^+ transporter AtAMT1;1. **Plant Physiology**, v.130, p.1263–1275, 2002.

KRONZUCKER H. J.; SCHJOERRING, J. K.; ERNER, Y.; KIRK, G. J. D.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Dynamic interactions between root NH_4^+ influx and long-distance N translocation in rice: Insights into feedback processes. **Plant Cell Physiology**, v.39, n.12, p.1287-1293, 1998.

KRONZUCKER H. J.; BRITTO D. T.; DAVENPORT R. J.; TESTER M. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, v.6, p335-337. 2001.

KUMAR, A.; SILIM, S. N.; OKAMOTO, M.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Differential expression of three members of the AMT1 gene family encoding putative high-affinity NH_4^+ transporters in roots of *Oryza sativa* subspecies indica. **Plant Cell and Environment**, v.26, p.907–914, 2003.

LAM, H.-M.; WONG, P.; CHAN, H.-K.; YAM, K.-M.; CHEN, L.; CHOW, C.-M.; CORUZZI, G. M. Overexpression of the ASN1 Gene Enhances Nitrogen Status in Seeds of Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.132, p.926-935, 2003.

LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Nitrogen use efficiency. Uptake of nitrogen from the soil. **Annals of Applied Biology**, v.149, n.3, p.243-247, 2006.

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

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

LOQUÉ D., YUAN I.; KOJIMA S.; GOJON A.; WIRTH J.; GAZZARRINI S.; ISHIYAMA K.; TAKAHASHO H.; von WIRÉN N. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. **The Plant Journal**, v.48, p.522-534, 2006.

LOQUÉ, D.; von WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.1293–1305, 2004.

MAYER, M.; LUDEWIG, U. Role of AMT1;1 in NH₄⁺ acquisition in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biology**, v.8, p.522–528, 2006.

MENGEL, DB.; BARBER, S. A. Rate of nutrient uptake per unit of root under field conditions. **Agronomy Journal**, v.66, p.399-402, 1974.

MIFLIN, B. J.; HABASH, D. Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.979, 987, 2002.

MIGGE, A.; CARRAYOL, E.; HIREL, B.; BECKER, T. W. Leaf-specific overexpression of plastidic glutamine synthetase stimulates the growth of transgenic tobacco seedlings. **Planta**, v.210, p.252-260, 2000.

ORTEGA, J. L.; TEMPLE, S. J.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Constitutive Overexpression of Cytosolic Glutamine Synthetase (GS1) Gene in Transgenic Alfalfa Demonstrates That GS1 May Be Regulated at the Level of RNA Stability and Protein Turnover. **Plant Physiology**, v.126, n.1, p.109-121, 2001.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant Soil**, v.174, p.3–28, 1995.

RABBANI, M. A ; PERVAIZ, Z. H ; MASOOD, M. S. Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (*Oryza sativa L.*) using RAPD markers. **Electronic Journal of Biotechnology**. v.11, n.3, 2008.

RAWAT, S. R.; SILIM, S. N.; KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. AtAMT1 gene expression and NH₄⁺ uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*: evidence for regulation by root glutamine levels. **The Plant Journal**, v.19, p.143–152, 1999.

RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. Cinética: software para estimar as constantes V_{máx} e K_M da equação de Michaelis-Menten. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, n. 10, 1992, Piracicaba. Anais... Piracicaba: **Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, p.124-125. 1992.

RUIZ, H. Estimativa dos parâmetros cinéticos K_m e V_{máx} por uma aproximação gráfico – matemática. **Revista Ceres, Viçosa**, v.32, n.179, p.79-84, 1985.

RUIZ, H.A. Estimativa dos parâmetros cinéticos em k_M e $V_{m\acute{a}x}$ por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres**. v.32, p.79-84. 1985.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning. A laboratory manual. 3ª Ed. **CSHL PRESS**, 2001.

SHI, W. M.; XU W. F.; LI S. M.; ZHAO X. Q.; DONG G.Q. Responses of two Rice cultivars differing in seedling-stage nitrogen use to growth under low-nitrogen conditions. **Plant Soil**, v.326, p.291-302, 2010.

SAITOU, N. e NEI, M. The neighbor-joining method a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**., v.4, p.406-425.. 1987.

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

SONODA, Y., IKEDA, A., SAIKI, S., YAMAYA, T. AND YAMAGUCHI, J. Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. **Plant Cell Physiol**, v.44, p.1396-1402, 2003b.

SUÁREZ, R.; MÁRQUEZ, J.; SHISHKOVA, S.; HERNÁNDEZ, G. Overexpression of alfalfa cytosolic glutamine synthetase in nodules and flowers of transgenic *Lotus japonicus* plants. **Physiologia Plantarum**, v.117, p.326-336, 2003.

SUENAGA, A.; MORIYA, K.; SONODA, Y.; IKEDA, A.; von WIRÉN, N.; HAYAKAWA, T.; YAMAGUCHI, J.; YAMAYA, T. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. **Plant and Cell Physiology**, v.44, p.206-211, 2003.

TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa L.*). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2319-2327, 2007.

TABUCHI, M.; SUGIYAMA, K.; ISHIYAMA, K.; INOUE, E.; SATO, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **The Plant Journal**, v.42, p.641-651, 2005.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK; A . R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J. A; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful a genetic marker. **Nucleic Acids Research**, v.18, 6531-6355, 1990.

YAN, F.; ZHU, Y.; MULLER, C.; ZORB, C.; SCHUBERT, S. Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. **Plant Physiology**, v.129, p.50-63, 2002.

YAO, S.; SONODA, Y.; TSUTSUI, T.; NAKAMURA, H.; ICHIKAWA, H.; IKEDA, A.; YAMAGUSHI, J. Promoter analysis of OsAMT1;2 and 1;3 implies their distinct roles in nitrogen utilization in rice. **Breeding Science**. v.58, p.201-207, 2008.

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

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

YUAN, L.; LOQUÉ, D.; YE, F.; FROMMER, W. B.; von WIRÉN, N. Nitrogen-dependent post-transcriptional regulation of the ammonium transporter AtAMT1;1. **Nature**, v.143, p.732–744, 2007.

ZHANG Y. H.; ZHANG Y.L.; SHEN Q.R. Nitrogen accumulation and translocation of different Japonica rice cultivars under different nitrogen application rates. **Pedosphere**, 2007
ZHAO, X.-Q., SHI, W.-M. Expression analysis of the glutamine synthetase and glutamate synthase gene families in young rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Plant Science**, v.170, p.748-754, 2006.