

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

DISSERTAÇÃO

**Acúmulo e Remobilização de NO_3^- e Eficiência de
Uso de Nitrogênio em Variedades Tradicional e
Melhorada de Arroz (*Oryza sativa* L.)**

Mônica Gouvêa Malheiros

2008



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

**ACÚMULO E REMOBILIZAÇÃO DE NO_3^- E EFICIÊNCIA DE USO
DE NITROGÊNIO EM VARIEDADES TRADICIONAL E
MELHORADA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

MÔNICA GOUVÊA MALHEIROS

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, Área de Concentração em Fisiologia da Produção.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2008

633.18
M249a
T

Malheiros, Mônica Gouvêa, 1983-

Acúmulo e remobilização de NO_3^- e eficiência de uso de nitrogênio em variedades tradicional e melhorada de arroz (*Oryza sativa L.*)/ Mônica Gouvêa Malheiros – 2008.

70 f. : il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.

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

Bibliografia: f. 65-70

1. Arroz - Cultivo – Teses. 2. Arroz - Solos – Teses. 3. Nitrogênio - Fixação – Teses. 4. Plantas – Efeito do nitrogênio - Teses I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Agronomia. III. Título.

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

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

MÔNICA GOUVÊA MALHEIROS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia, área de Concentração em Fisiologia da Produção.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/02/2008.

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

Altamiro Souza de Lima Ferraz Junior. Dr. UEMA

Vera Lúcia Divan Baldani. Dra. Embrapa Agrobiologia.

A Deus, fortaleza e luz do meu caminho;
Aos meus amados pais, Moacir José Malheiros e Suely Gouvêa Malheiros, que são a base
da minha vida;
A minha linda irmã Juliana Gouvêa Malheiros, amiga e incentivadora dos meus estudos;
Ao meu querido esposo, Leonard Romoaldo Nascimento, amor da minha vida;

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força, sabedoria e inteligência para que eu chegasse ao final dessa caminhada com sucesso; por ter me guiado e me protegido todos os dias nas idas e vindas da Rural;

Aos meus amados pais, Moacir e Suely, pela educação, carinho, amor e incentivos para que meu sonho se tornasse realidade;

A minha querida irmã Juliana, pelo incentivo e apoio incondicional em todos os momentos;

Ao meu grande e eterno amor Leonard, pelo carinho, paciência e compreensão, nestes dois anos de dedicação quase exclusiva aos estudos, para que eu alcançasse meus objetivos;

Ao querido Prof. Manlio Silvestre Fernandes, pela valiosa orientação e ensinamentos, pelo carinho, confiança e oportunidade, acreditando no meu potencial;

A minha querida Prof.^a Sonia Regina de Souza, que com carinho e atenção me incentivou, aconselhou e co-orientou na condução deste trabalho;

A querida Elvia Mariam Lis Martinez Stark pela amizade, carinho e palavras de incentivo para que eu concluísse a dissertação;

Aos amigos Leandro Azevedo Santos e Carlos Alberto Bucher, pelo apoio na condução dos trabalhos e análises laboratoriais; por terem me ajudado em todos os momentos que precisei sem nunca se negarem e por terem dividido seus conhecimentos comigo;

Ao amigo Wallace Luís de Lima, mais conhecido como “Walla” ou “Renato”, pela ajuda nas longas análises laboratoriais, que pareciam infinitas;

Aos bolsistas, estagiários, mestrandos, doutorandos e acima de tudo amigos: Marcos, Rafael, Leandro, Osmário, Natália e Flavinho pela ajuda constante no laboratório;

Aos queridos e eternos amigos Mariella Camargo Rocha e Fábio Mathias Corrêa, que me acompanharam nessa caminhada, sempre me ajudando e incentivando;

As minhas grandes e especiais amigas Ana Paula Gomes de Castro e Adriana da Fonseca Martinho Durães, que mesmo distantes, torceram por mim, me deram força e acreditaram na realização do meu sonho;

A todos do CPGF, principalmente a prof.^a Gorete, pela atenção e competência na coordenação e a Ellen, pela ajuda em tudo que precisei;

Aos amigos do CPGF, André, Taís, Marcus, Antônio, Ricardo, Ilzo, Camila, Diego e Fernanda que entraram para o mestrado ou doutorado no mesmo período que eu e compartilhamos os primeiros meses dessa caminhada, e que pouco a pouco fomos superando as dificuldades, seguindo cada um seu lindo caminho até chegarmos aqui;

A todos do CPGA-CS, principalmente a Luciene e Roberto, que me receberam com tanto carinho e sempre estavam dispostos a me ajudar. Embora eu não fosse do curso, me fizeram sentir parte dele;

A CAPES, por financiar nossos projetos de pesquisa, permitindo a formação de mestres e doutores;

Enfim, a todos aqueles, cujos nomes não citei, mas sabem que foram importantes para mim nessa jornada e que ficarão guardados em meu coração;

AGRADEÇO

Filosofia do Sucesso

Se você pensa que é um derrotado,
Você será derrotado.
Se não pensar “quero a qualquer custo!”,
Não conseguirá nada.

Se você fizer as coisas pela metade,
Você será fracassado.
Nós descobrimos neste mundo,
Que o sucesso começa pela intenção da gente
E tudo se determina pelo nosso espírito.

Se você pensa que é um malgrado,
Você se torna como tal.
Se almeja atingir uma posição mais elevada,
Deve, antes de obter a vitória,
Dotar-se da convicção de que
Conseguirá infalivelmente.

A luta pela vida nem sempre é vantajosa
Aos fortes nem aos espertos.
Mais cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória
É aquele que crê plenamente
EU CONSEGUIREI!

Hill

BIOGRAFIA

Mônica Gouvêa Malheiros, filha de Moacir José Malheiros e Suely Gouvêa Malheiros, nasceu em 26 de Janeiro de 1983, no Rio de Janeiro - RJ. Concluiu o ensino fundamental no Colégio Eduardo Guimarães, cursando em seguida o ensino médio no Colégio da Cidade. No ano de 2001, ingressou no curso de graduação em Agronomia da Universidade federal Rural do Rio de Janeiro. Durante a graduação, estagiou na área de Fitotecnia, do Instituto de Agronomia da Rural, sob a orientação do prof. Luiz Beja Moreira. Em seguida, foi bolsista por dois anos do CNPq/Pibic, na área de Fertilidade do Solo, no departamento de Solos do Instituto de Agronomia, sob a orientação do prof. Everaldo Zonta. Diplomou-se em 2006 e no mesmo ano, ingressou no curso de pós-graduação em Fitotecnia na mesma universidade, desenvolvendo sua dissertação de mestrado sob a orientação do prof. Manlio Silvestre Fernandes e em 03 de Junho casou-se com um empresário, Leonard Romoaldo Nascimento. Em fevereiro de 2008, obteve o título de Mestre em Ciências em Fitotecnia.

RESUMO

MALHEIROS, Mônica Gouvêa. **Acúmulo e remobilização de NO_3^- e eficiência de uso de nitrogênio em variedades tradicional e melhorada de arroz (*Oryza sativa* L.).** 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A dinâmica de acúmulo e remobilização do NO_3^- relacionada ao conteúdo de proteína nos grãos foi estudada em duas variedades de arroz, Piauí (tradicional do Estado do Maranhão) e IAC-47 (melhorada por instituições de pesquisa). O experimento foi conduzido em casa de vegetação da UFRuralRJ no período de Agosto de 2006 a Fevereiro de 2007, com delineamento experimental inteiramente casualizado com arranjo fatorial $2 \times 2 \times 4$, constituído por duas variedades, duas doses de N-NO_3^- , 0 e 150 Kg N.ha^{-1} , e quatro épocas de coleta, aos 35 dias após o transplântio (DAT), 15 e 30 dias após a antese (DAA), e uma coleta final dos grãos e da matéria seca, com três repetições. A cada coleta, as plantas foram cortadas rente ao solo e separadas em folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo. Em cada segmento foram analisadas as frações nitrogenadas (NO_3^- , NH_4^+ e N-amino), açúcares solúveis, N-total e determinadas as atividades das Nitrato Redutase, P- H^+ -ATPase, V- H^+ -ATPase, H^+ -PPase e Glutamina Sintetase. Nos grãos, determinou-se o peso de 1000 grãos, número de grãos cheios e chochos por vaso, dimensões (comprimento, largura e espessura) e o conteúdo de N-total, proteína bruta e suas frações protéicas e a relação glutelina/proteína bruta. A maior capacidade de acúmulo e remobilização do NO_3^- , sob condições de menor disponibilidade de nitrogênio, foi atribuída a variedade Piauí, por apresentar um maior teor de nitrato em detrimento ao crescimento vegetativo, na fase inicial de crescimento e maior atividade das V- H^+ -ATPases encontradas no início do período reprodutivo e uma menor quantidade de nitrogênio, tanto na forma solúvel (NO_3^-), quanto estrutural (N-protéico e outros), no final do ciclo, utilizando de forma mais rápida o N após a antese, direcionando-o para formação e enchimento dos grãos. Embora o teor de proteína bruta e suas frações protéicas não diferiram entre as variedades, sob a menor dose de N, a variedade tradicional, apresentou maior produtividade. Sendo assim, estes resultados indicam maior eficiência no uso de N pela variedade Piauí sob condições de menor disponibilidade deste nutriente.

Palavra chave: nitrato, nitrato redutase, bombas de prótons, glutamina sintetase, glutelina.

ABSTRACT

MALHEIROS, Mônica Gouvêa. **Accumulation and remobilization of NO_3^- and efficiency in the use of nitrogen in traditional and improved varieties of rice (*Oryza sativa* L.)**. 2008. 70f. Dissertation (Master Science in Fitotecnia) Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The dynamics of accumulation and remobilization of NO_3^- related protein content of the grains was studied in two varieties of rice, Piauí (traditional state of Maranhão) and IAC-47 (enhanced by research institutions). The experiment was conducted in a greenhouse of UFRuralRJ in the period August 2006 to February 2007, with a completely randomized design with a factorial arrangement $2 \times 2 \times 4$, consisting of two varieties, two levels of N- NO_3^- , 0 and 150 kg N.ha^{-1} , and four times of collection, to 35 days after transplanting (DAT), 15 and 30 days after anthesis (DAA) and a final collection of grain and dry, with three replications, with three replicates. Each collection, the plants were cut at ground level and separated in flag leaf, leaf 2, and lower leaf sheath + stem. In each segment the fractions were analyzed nitrogen (NO_3^- , NH_4^+ and N-amino), soluble sugars, N-total and certain activities of nitrate Redutase, P- H^+ -ATPase, V- H^+ -ATPase, H^+ -PPase and Glutamine Sintetase. In grains, it was determined the weight of 1000 grains, number of full and hollow grains per pot, size (Length, width and thickness) and content of N-total, crude protein and protein fractions and the relationship glutelin/crude protein. The greater capacity of accumulation and remobilization of NO_3^- , under conditions of lower availability of nitrogen, was given the variety Piauí, by presenting a higher content of nitrate in detriment to growth, in the initial phase of growth and increased activity of V- H^+ -ATPases found at the beginning of the reproductive period and a lower amount of nitrogen, in both the soluble form (NO_3^-), as structural (N-protein and others), at the end of the cycle, using the fastest way the N after anthesis, directing it to training and filling of grains. Although the content of crude protein and protein fractions not differ among varieties, on the lowest level of N, the traditional variety, showed higher productivity. Therefore, these results indicate greater efficiency in the use of N by the variety Piauí under conditions of low availability of this nutrient.

Key word: nitrate, nitrate reductase, pumps protons, glutamine synthetase, glutelin.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produção mundial de arroz em 2005.	3
Tabela 2. Temperaturas máximas e mínimas diárias e temperatura, intensidade luminosa e umidade relativa medidas às 9, 12 e 15 horas, durante a condução do experimento no interior da casa de vegetação.	33
Tabela 3. Conteúdo de NO_3^- ($\mu\text{mol.parte da planta}^{-1}$) na folha bandeira (FB), folha 2 (F2), folhas inferiores (FI) e bainha+colmo (B+C), aos 35 dias após transplântio (DAT), aos 15 e 30 dias após antese (DAA) de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), com ou sem $150 \text{ Kg N-NO}_3^- .\text{ha}^{-1}$	40
Tabela 4. Frações nitrogenadas e açúcares solúveis totais na parte aérea, aos 35 dias após transplântio (DAT), aos 15 e 30 dias após antese (DAA) de duas variedades de arroz, submetidas á dois níveis de N-NO_3^- (0 e $150 \text{ Kg N-NO}_3^- .\text{ha}^{-1}$).	47
Tabela 5. N-total aos 35 dias após transplântio (DAT), aos 15 e 30 dias após antese (DAA) de duas variedades de arroz, submetidas á dois níveis de N-NO_3^-	50
Tabela 6. Espessura, comprimento, largura, relação comprimento largura e peso de mil grãos das variedades de arroz (Piauí e IAC-47), com ou sem adubação de $150 \text{ Kg N-NO}_3^- .\text{ha}^{-1}$	60
Tabela 7. Produção de grãos (totais e cheios) por vaso das variedades de arroz (Piauí e IAC-47), com ou sem adubação de $150 \text{ Kg N-NO}_3^- .\text{ha}^{-1}$	61

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo da via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) para assimilação de amônio e atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) (PimenteL, 2004).....8
- Figura 2.** Esquema da via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) e atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH). Aaminação: incorporando amônio e formando glutamato; e desaminação: catalisando a oxidação do glutamato a α -cetoglutarato, liberando amônio (Souza & Fernandes, 2006).....9
- Figura 3.** Visão geral da absorção de nitrato; redução, exportação e acúmulo de nitrato; assimilação de amônio. T (tonoplasto) e MP (membrana plasmática). (1) P-H⁺-ATPase; (2) transportador de NO₃⁻ (simporte); (3) transportador de NH₄⁺ (uniporte); e (4) canal de NO₃⁻ (Souza & Fernandes, 2006).10
- Figura 4.** Visão geral da remobilização de nitrato do vacúolo. (5) V-H⁺-ATPase; (6) H⁺-PPase; (7) transportador de NO₃⁻ (simporte: H⁺ / NO₃⁻) (Souza & Fernandes, 2006).....12
- Figura 5.** (A). Larva de broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis*; (B). Panículas vazias (Barrigossi et al., 2004).15
- Figura 6.** Adulto do percevejo-do-colmo, *Tibraca limbativentris* (Barrigossi et al.,2004).....15
- Figura 7.** (A) Casa de vegetação do Deptº de Solos do Instituto de Agronomia, na qual foi conduzido o experimento. (B) Sementes das variedades PiauÍ e IAC-47.....19
- Figura 8.** Germinação das sementes de arroz em potes contendo água destilada e gaze.20
- Figura 9.** Transplântio das plântulas para os vasos aos dez dias após a germinação.20
- Figura 10.** Esquema representativo do experimento conduzido com duas variedades de arroz (PiauÍ e IAC-47) desde a germinação até a coleta final dos grãos. G: Germinação; T: Transplântio; FCE: Fase de Crescimento Exponencial; A: Antese; FEG: Fase de Enchimento dos grãos; GM: Grãos Maduros.21
- Figura 11.** (A) Termômetro para medir temperaturas máxima e mínima; (B) Termohigrômetro para medir umidade relativa; (C) Radiômetro para medir a intensidade luminosa.21
- Figura 12.** Fotografia de planta de arroz nas três épocas de coleta. (A). Primeira coleta aos 35 dias após o transplântio (DAT); (B). Segunda coleta aos 15 dias após a antese (DAA); e (C). Terceira coleta aos 30 dias após a antese (DAA).22

Figura 13. (A). Grãos cheios; (B). Grãos chochos; (C). Raqui.	26
Figura 14. (A). Processo de descascamento dos grãos; (B). Paquímetro digital para medição do comprimento, largura e espessura (mm) dos grãos.	27
Figura 15. Teores de Albumina+globulina, de prolamina e de glutelina conforme as etapas de extrações salinas, alcoólicas e alcalinas, respectivamente, dos grãos de arroz de duas variedades sem e com adubação nítrica. 1 ^a , 2 ^a , 3 ^a , 4 ^a , 5 ^a , 6 ^a e 7 ^a – operações de extração.....	29
Figura 16. Temperaturas Máximas, Mínimas e Médias (°C), nos meses de Agosto a Fevereiro, em casa de vegetação, durante o cultivo de arroz.....	30
Figura 17. Temperaturas (°C) e Umidades Relativas (%) às 9, 12 e 15 horas, nos meses de Agosto a Fevereiro, em casa de vegetação, durante o cultivo de arroz.....	31
Figura 18. Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) às 9, 12 e 15 horas, nos meses de Agosto a Fevereiro, em casa de vegetação, durante o cultivo de arroz.....	31
Figura 19. Plantas das variedades Piauí (1 e 2) e IAC-47 (3 e 4) aos 35 dias após o transplântio (DAT), com e sem adubação suplementar de 150 Kg N-NO ₃ ⁻ . ha ⁻¹ . (1. Piauí sem adubação; 2. Piauí com 150 Kg N.ha ⁻¹ ; 3. IAC-47 sem adubação e 4. IAC-47 com 150 Kg N.ha ⁻¹)......	34
Figura 20. Massa Fresca (g planta ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.	35
Figura 21. Plantas das variedades Piauí (1 e 2) e IAC-47 (3 e 4) aos 35 dias após o transplântio (DAT), com e sem adubação suplementar de 150 Kg N-NO ₃ ⁻ . ha ⁻¹ . (1. Piauí sem adubação; 2. Piauí com 150 Kg N.ha ⁻¹ ; 3. IAC-47 sem adubação e 4. IAC-47 com 150 Kg N.ha ⁻¹)......	36
Figura 22. Massa Fresca total (g planta ⁻¹) de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese.....	37
Figura 23. Plantas das variedades Piauí (1 e 2) e IAC-47 (3 e 4) aos 35 dias após o transplântio (DAT), com e sem adubação suplementar de 150 Kg N-NO ₃ ⁻ . ha ⁻¹ . (1. Piauí sem adubação; 2. Piauí com 150 Kg N.ha ⁻¹ ; 3. IAC-47 sem adubação e 4. IAC-47 com 150 Kg N.ha ⁻¹)......	37
Figura 24. Teores de N-NO ₃ ⁻ ($\mu\text{mol.g massa fresca}^{-1}$) na folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com	

150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	39
Figura 25. Teores de N-NH ₄ ⁺ (µmol.g massa fresca ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	42
Figura 26. Teores de N-amino (µmol.g massa fresca ⁻¹) na folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	43
Figura 27. Teores de açúcares solúveis (g.g massa fresca ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	44
Figura 28. Teores de N-total (mg.g matéria seca ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	49
Figura 29. Atividade da Nitrato Redutase (µM NO ₂ ⁻ .g massa fresca ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2. ...	52
Figura 30. Atividade da P-H ⁺ -ATPase (µmol Pi mg ⁻¹ ptn.min ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	54
Figura 31. Atividade da H ⁺ -PPase (µmol Pi mg ⁻¹ ptn.min ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	56
Figura 32. Atividade da V-H ⁺ -ATPase (µmol Pi mg ⁻¹ ptn.min ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	57

Figura 33. Atividade da Glutamina Sintetase (nmol de γ -glutamil.g massa fresca ⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO ₃ ⁻ ha ⁻¹ . DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.....	59
Figura 34. Característica morfológica dos grãos de arroz. (A) Grãos da variedade Piauí (tipo médio e forma semi-arredondada); (B) Grãos da variedade IAC-47 (tipo longo e forma meio alongada).....	60
Figura 35. Teores de proteína bruta e frações protéicas (glutelina, albumina+globulina e de prolamina) (mg de proteína . g farinha ⁻¹) dos grãos de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) com ou sem adubação de 150 Kg N-NO ₃ ⁻ .ha ⁻¹	61
Figura 36. Teores de N-total (mg g farinha ⁻¹) dos grãos cheios, grãos chochos, casca (palea e lema) dos grãos cheios e ráquis de arroz de duas variedades (Piauí e IAC-47) com ou sem adubação de 150 Kg N-NO ₃ ⁻ .ha ⁻¹ ..	63
Figura 37. Relação entre o teor de proteína bruta e o teor de glutelina (mg . g farinha ⁻¹) dos grãos de arroz.....	63

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AS	Açúcares Solúveis
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina de Soro Bovino (Bovine Serum Albumine)
B+C	Bainha+Colmo
DAA	Dias Após Antese
DAG	Dias Após Germinação
DAT	Dias Após Transplântio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethyl-ether)-N,N,N',N',tetraacetic acid
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EUN	Eficiência no Uso de Nitrogênio
Fd	Ferredoxina
FB	Folha Bandeira
F2	Folha 2
FI	Folhas Inferiores
GS1	Glutamina Sintetase citossólica
GS2	Glutamina Sintetase
GOGAT	Glutamato Sintase
GDH	Glutamato Desidrogenase
P-H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase de plasmalema
V-H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase de vacúolo
H ⁺ -PPase	Pirofosfatase translocadora de prótons
H ⁺	Próton
IL	Intensidade Luminosa
iHATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System) indutivos
cHATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (High Affinity Transport System) constitutivos
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (Low Affinity Transport System)
Km	Afinidade da enzima pelo substrato
NADH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida
NR	Nitrato Redutase
NIR	Nitrito Redutase
NRT1	Família de genes para os transportadores de NO ₃ ⁻ de baixa afinidade
NRT2	Família de genes para os transportadores de NO ₃ ⁻ de alta afinidade
NO ₃ ⁻	Nitrato
NH ₄ ⁺	Amônio
NO ₂ ⁻	Nitrito
PMSF	Polimetilssulfonil fluoreto
PB	Proteína Bruta
PVP	Polivinilpirrolidona

RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
UR	Umidade Relativa
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesufonic acid) hemisodium salt
BTP	1,3-Bis[Tris(hydroxymethyl)methylamino]propane
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfônico
PPi	Pirofosfato
Pi	Fosfato
Δp	Força Próton Motriz

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	3
2.2 CARACTERÍSTICAS MORFO-AGRONÔMICAS DO ARROZ	3
2.2.1 Período vegetativo	4
2.2.2 Período reprodutivo.....	4
2.2.3 Formação e enchimento de grãos.....	4
2.3 NITROGÊNIO	5
2.4 ABSORÇÃO DO NITROGÊNIO PELAS PLANTAS	5
2.4.1 P-H ⁺ -ATPase	6
2.5 REDUÇÃO DO NITRATO NOS VEGETAIS.....	7
2.5.1 Nitrato Redutase	7
2.6 ASSIMILAÇÃO DE NH ₄ ⁺	7
2.6.1 Glutamina sintetase, Glutamato sintase e Glutamato desidrogenase.....	8
2.7 ACÚMULO DO NITRATO NO VACÚOLO.....	10
2.8 REMOBILIZAÇÃO DO NITRATO ACUMULADO.....	11
2.8.1 V-ATPase Vacuolar	11
2.8.2 H ⁺ -PPase Vacuolar (Pirofosfatase).....	11
2.9 PROTEÍNA BRUTA E FRAÇÕES PROTÉICAS DOS GRÃOS DE ARROZ	12
2.10 FATORES QUE INFLUENCIAM O ENCHIMENTO DOS GRÃOS	14
2.10.1 Fatores Bióticos.....	14
2.10.2 Fatores Abióticos.....	15
2.11 EFICIÊNCIA NO USO DE NITROGÊNIO (EUN)	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	19
3.2 GERMINAÇÃO	19
3.3 TRANSPLANTIO.....	20
3.4 CONDUÇÃO DO EXPERIMENTO	20
3.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	21
3.6 CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS PLANTAS.....	21
3.7 COLETAS E ANÁLISE DO MATERIAL SECO E FRESCO	22
3.7.1 Atividade da Enzima Nitrato Redutase (NR)	22
3.7.2 Frações solúveis	23
3.7.3 Atividade das Enzimas P-H ⁺ -ATPase, V-H ⁺ -ATPase e H ⁺ -PPases.....	24
3.7.4 Atividade das Enzimas Glutamina Sintetase (GS)	25
3.7.5 N-Total.....	26
3.7.6 Análise dos grãos.....	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 CONDIÇÕES AMBIENTAIS DA CASA DE VEGETAÇÃO	30
4.2 CARACTERÍSTICA MORFOLÓGICA DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS.....	34
4.2.1 Massa Fresca.....	34
4.3 CARACTERÍSTICAS QUANTITATIVAS DA PARTE AÉREA DAS PLANTAS	38
4.3.1 Frações nitrogenadas e açúcares solúveis	38
4.3.2 N-Total.....	48
4.3.3 Atividade da enzima Nitrato Redutase.....	51
4.3.4 Atividade das enzimas P-H ⁺ -ATPase, V-H ⁺ -ATPase e H ⁺ -Ppase	53
4.3.5 Atividade da enzima Glutamina Sintetase.....	58
4.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E QUANTITATIVA DOS GRÃOS	60
4.4.1 Morfologia e peso dos grãos.....	60
4.4.2 Acúmulo de proteína nos grãos	61
5 CONCLUSÃO	64
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

O arroz, junto ao milho e o trigo, é um dos cereais mais produzido mundialmente. É de suma importância na dieta alimentar da população brasileira por fornecer calorias e proteínas de grande valor nutritivo para o homem, tornando-se a base da alimentação da população de baixa renda. O nitrogênio (N), que é o nutriente mineral quantitativamente mais requerido dentre os elementos essenciais necessários ao desenvolvimento das plantas, torna-se indispensável para o aumento de produtividade e do teor de proteína nos grãos.

Durante a Revolução Verde, os adubos nitrogenados e o petróleo eram abundantes e baratos, ocorrendo um incremento no uso de fertilizantes, principalmente nitrogenados, para aumentar a produtividade. O uso intensificado de fertilizantes era combinado à utilização de variedades melhoradas que respondessem à aplicação de fertilizantes, as chamadas plantas “responsivas”. Na década de 70, com a crise do petróleo, esse ideotipo de planta não era o mais indicado, optando-se por variedades que fossem mais eficientes no uso de nutrientes, principalmente para agricultura tropical, na qual a produção é feita com tecnologia de baixos insumos e os solos têm pouca disponibilidade de nitrogênio, optou-se então pelas variedades tradicionais. Portanto, a estratégia de adaptar o solo às exigências das culturas, através da aplicação de maiores quantidades de insumos agrícolas, tornou-se uma estratégia pouco eficiente para essas novas condições de cultivo. Busca-se hoje, adaptar a planta às condições ambientais.

O nitrogênio presente nos solos é absorvido pelas plantas, principalmente, na forma inorgânica como amônio (NH_4^+) ou nitrato (NO_3^-) através do sistema radicular. O nitrato absorvido pode ser transportado no interior da planta e ser acumulado no vacúolo para posterior utilização, diferentemente do amônio, cujo acúmulo é tóxico para as plantas, devendo ser imediatamente incorporado como N-orgânico. Porém, o uso indiscriminado do nitrato por meio das adubações nítricas, tem sido uma das grandes preocupações, por poder ocasionar contaminação do solo e do lençol freático. Deste modo, a busca por variedades mais eficientes no uso de nitrogênio (EUN), não está relacionada somente aos problemas econômicos, mas também aos ambientais.

Diante deste cenário, estudos têm sido realizados em variedades tradicionais de arroz do Estado do Maranhão, que aparentemente sofreram um processo de adaptação, apresentando uma maior EUN quando comparadas com variedades melhoradas.

Um processo adaptativo de plantas a ambientes, onde a disponibilidade desse nutriente é baixa e ocorre em “fluxos” sazonais, seria a rápida absorção e acúmulo de NO_3^- nos estágios iniciais de desenvolvimento com sua posterior utilização durante as diferentes fases do desenvolvimento do vegetal, sendo menos dependente de fontes externas de nitrogênio na fase reprodutiva. Neste processo, está envolvida uma série de enzimas, destacando-se as P-H^+ -ATPase, V-H^+ -ATPase, H^+ -PPase, Nitrato Redutase, e Glutamina Sintetase.

As hipóteses desta dissertação são de que a dinâmica de acúmulo e remobilização de NO_3^- nas plantas de arroz se dão de forma mais eficiente para variedades tradicionais quando comparadas às variedades melhoradas, resultando em maior eficiência no uso de nutrientes e maior teor de proteína nos grãos. Espera-se que a maior eficiência das variedades tradicionais em relação às variedades melhoradas esteja relacionada a mecanismos de absorção e assimilação de N, e que eles possam ser identificados por meio da análise da atividade das enzimas de assimilação de nitrogênio, dos teores das frações nitrogenadas e de açúcares livres e do acúmulo de proteínas solúveis nos grãos, ajudando no entendimento da dinâmica de acúmulo e remobilização de NO_3^- em arroz.

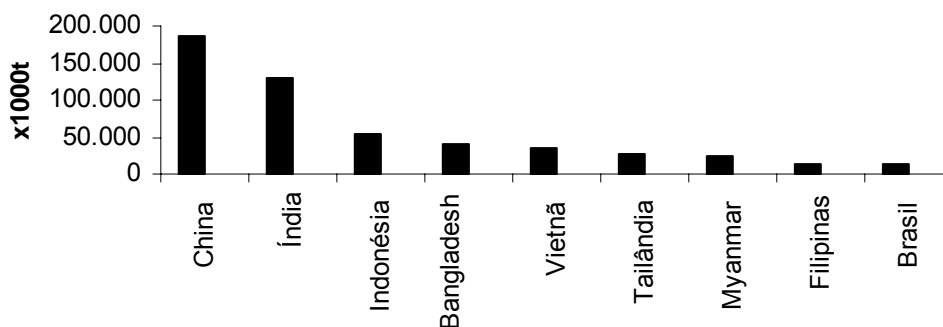
Considerando que o conhecimento de características relacionadas a essa eficiência, torna-se importante para programas de melhoramento genético, esta dissertação tem por objetivos e metas gerais, determinar, entre variedades tradicional e melhorada de arroz, características de acúmulo e remobilização de NO_3^- , correlacionando à eficiência no uso de nitrogênio; bem como, identificar características de acúmulo e remobilização de N que possam ser relacionadas a um maior conteúdo de proteína nos grãos de arroz.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância econômica

O arroz é um dos três cereais mais consumido mundialmente, constituindo-se na alimentação básica de mais da metade da população mundial, que estima-se em 6,6 bilhões de pessoas (WANDER, 2006). De acordo com dados divulgados pela FAO em 2006, a Ásia é o maior produtor mundial de arroz com 90,5% da produção, enquanto que o Brasil ocupa a 9ª posição mundial e a 1ª posição entre os países da América do Sul (Tabela 1). A produção mundial no ano agrícola de 2005 atingiu 618 milhões de toneladas, sendo China e Índia os maiores produtores, participando com 30,0% e 20,9%, e o Brasil com 2,1% (FAO, 2006). O consumo *per capita* no Brasil é de 52,5 Kg. Ano⁻¹. Já em termos de produtividade (produção por área), surpreendentemente, os países com os mais altos índices não estão na Ásia. Baseado nas estatísticas da FAO, o país com produtividade mais elevada para o arroz é o Egito, com aproximadamente 9,5 mil quilos por hectare em 2004, seguido da Austrália, Grécia e Estados Unidos. A China encontra-se em 10º lugar e o Brasil ocupa a 45ª posição no ranking mundial com 3,6 mil kg/ha em 2004 (PEROZZI, 2005).

Tabela 1. Produção mundial de arroz em 2005.



Os sete maiores Estados produtores de arroz do Brasil são Rio Grande do Sul (46% da produção nacional); Mato Grosso (17%); Santa Catarina (8%); Maranhão e Pará (cerca de 5% cada um); Tocantins (4%); e Goiás (3%). O Estado do Maranhão, como o 4º maior produtor de arroz, apresenta um maior número de variedades tradicionais do país, que ainda são conservadas por agricultores de baixa tecnologia, tornando-se assim, um Estado de grande interesse no estudo dessas variedades (PEROZZI, 2005).

2.2 Características Morfo-agronômicas do arroz

O arroz pertence à família Poaceae (gramíneas), do gênero *Oryza* e seção *Sativa*. É uma planta hidrófila, de hábito aquático ou terrestre, que apresenta sistema radicular fasciculado, colmos (caule) redondos e ocos, limbo foliar linear, plano, longo a estreito, lanceolado e achatado, distribuído alternadamente ao longo do colmo, fixando-se a este pela bainha foliar e inflorescência terminal em forma de panícula. Seu porte pode variar de 40 cm (anãs) até 7 m (flutuantes). Esta cultura se reproduz tanto por via sexual quanto vegetativa. Normalmente, sua cultura é conduzida como se fosse uma planta anual, pois sob condições de seca e frio, após a colheita encerram seu ciclo, no entanto, sob condições térmicas e hídricas haverá novo crescimento – a soca – muitas vezes utilizada com rendimento apreciável de

grãos (FORNASIERI FILHO & FORNASIERI, 1993; FORNASIERI FILHO & FORNASIERI, 2006).

A bainha foliar pouco contribui para a fotossíntese, mas desempenha funções de suporte mecânico de toda a planta e de armazenagem temporário para amido e açúcar antes do florescimento. Os carboidratos acumulados na bainha foliar e no colmo se translocarão para os grãos após o florescimento estimando-se que sua contribuição se acha entre 0-40% dos carboidratos acumulados nos grãos, na dependência das doses de N aplicadas e da duração do ciclo da cultivar.

A panícula é composta pela raqui principal, de cujos nós saem ramificações primárias e destas, dão origem as ramificações secundárias de onde surgem as espiguetas. A espiguetas acha-se envolvida por uma casca (pálea e lema) e contém em seu interior seis estames, um ovário unilocular com estilete curto e estigma plumoso bífido; e externamente na base da espiguetas, duas glumelas. Seu fruto denomina-se cariopse, que é formada por embrião, endosperma, tegumento e pericarpo (FORNASIERI FILHO & FORNASIERI, 2006).

O ciclo de desenvolvimento do arroz compreende três períodos: vegetativo, reprodutivo e formação e enchimento de grãos, com duração de 100 a 140 dias em média. A maior parte da variação de ciclo entre cultivares ocorre no período vegetativo.

2.2.1 Período vegetativo

O período vegetativo vai da germinação da semente à diferenciação do primórdio floral. No período de 10 a 14 dias após a emergência, a plântula mantém-se às custas das reservas presentes no grão e com sistema radicular temporário até surgirem as raízes adventícias dos nós do colmo. Após o estabelecimento inicial, a planta começa a desenvolver sua estrutura foliar, formando uma folha em cada nó, de forma alternada no colmo. Durante as primeiras três a quatro semanas após a emergência, a planta começa a emitir perfilhos, que surgem do colmo de forma alternada e nas quatro a cinco semanas de desenvolvimento, todas as folhas já estão formadas. Quando a planta diferencia o número total de folhas, ocorre uma mudança rápida e brusca na função do ponto de crescimento que se diferencia numa minúscula panícula. Diz-se que a planta atingiu o estágio de diferenciação do primórdio floral (FARSUL, 2007).

2.2.2 Período reprodutivo

O período reprodutivo ocorre desde a diferenciação do primórdio floral até o florescimento. A sua duração varia de três a cinco semanas. A partir da diferenciação, os entrenós do colmo começam a se alongar rapidamente e a planta cresce bastante. Após a diferenciação do primórdio floral, a panícula cresce em taxas elevadas, estando envolvidas pelas bainhas das folhas, este período é chamado de emborrachamento. O arroz é uma planta autofecundada, com a polinização ocorrendo da extremidade superior da panícula para a base. Por ocasião do florescimento, a planta atinge sua máxima estatura aérea foliar. (FARSUL, 2007).

2.2.3 Formação e enchimento de grãos

Esse período vai do florescimento à maturação fisiológica do grão que varia de 30 a 40 dias. Na maturação fisiológica, já está determinado o peso dos grãos. Sendo que a deficiência nutricional e a ocorrência de pragas durante o período de enchimento dos grãos refletem em maior ou menor peso dos grãos (FARSUL, 2007).

2.3 Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos elementos minerais requeridos em maior quantidade pelas plantas e que mais limita o crescimento, por ser um nutriente que faz parte de proteínas, ácidos nucleicos e outros importantes constituintes celulares. Sua deficiência resulta em clorose gradual das folhas mais velhas e diminuição do crescimento da planta; inicialmente em detrimento das reservas da parte aérea, a planta promove alongamento do sistema radicular, como uma tentativa de “buscar” o nutriente (SOUZA & FERNANDES, 2006).

Embora a atmosfera contenha vastas quantidades de nitrogênio (N₂) – cerca de 78% em volume – a maioria dos organismos não pode acessar diretamente esse imenso reservatório devido à ligação covalente estável entre dois átomos de nitrogênio (N≡N) que o torna um gás inerte (EPSTEIN & BLOOM, 2006) havendo a necessidade do N ser adicionado ao solo para as plantas por meio de fertilizantes minerais, restos orgânicos diversos ou por fixação biológica.

Para aumentar a produção, agricultores de todo o mundo aplicam mais de 80 milhões t³ de fertilizantes nitrogenados ano⁻¹. Sua produção e aplicação somam mais da metade da energia consumida na agricultura (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

Obviamente, aumentar a eficiência com que as plantas obtêm N é de importância crítica.

2.4 Absorção do nitrogênio pelas plantas

Embora o nitrogênio esteja disponível no solo em diversas formas como aminoácidos, peptídeos e formas complexas insolúveis, os vegetais superiores o absorvem preferencialmente sob a forma inorgânica, nítrica (NO₃⁻) ou amoniacal (NH₄⁺) (WILLIAMS & MILLER, 2001; BRITTO et al., 2001).

Uma vez no interior da célula, o NH₄⁺ deve ser imediatamente assimilado logo na raiz, ou seja, incorporado a esqueletos de carbono, ficando na forma orgânica, por ser um íon tóxico à planta mesmo em baixas concentrações, não podendo ficar livre na célula e tecidos. Já o NO₃⁻ pode seguir diversos caminhos. Ele pode ser imediatamente reduzido a NH₄⁺ para ser assimilado já na raiz, pode ser exportado pelos vasos condutores para parte aérea e ser assimilado ou ser acumulado no vacúolo, quando disponível em excesso, para posterior uso sem serem assimilados sob forma de moléculas orgânicas (RICHTER, 1993; HIREL et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004).

Sendo assim, o NO₃⁻ é a forma de N mais viável em ambientes cuja disponibilidade deste nutriente é sazonal, podendo, a planta, absorver e acumular o NO₃⁻ na época de maior disponibilidade e utilizá-lo nas fases em que for escasso.

O NO₃⁻ é considerado absorvido quando há passagem destes do meio externo para o interior da célula através da membrana plasmática mediada por sítios específicos de origem protéica. Sua absorção é ativa secundária – feita contra um gradiente de potencial eletroquímico - e ocorre através de um transportador do tipo simporte com 2H⁺.

Dependendo da concentração deste íon na solução do solo, ele pode ser absorvido pelos transportadores de NO₃⁻ de alta (HATs) ou de baixa (LATs). Afinidade. O sistema de alta afinidade opera quando a concentração do NO₃⁻ é menor ou igual a 1 mM, sendo absorvido pelos transportadores de alta afinidade (NRT2). Há o sistema passível de indução (iHATs) que só aparece quando há NO₃⁻ no meio externo, e os constitutivos (cHATs) que já existem na planta independentemente de haver ou não NO₃⁻ no exterior da planta. Já o sistema de baixa afinidade (NTR1) só opera quando a concentração desse íon é superior a 1 mM. (SOUZA & FERNANDES, 2006). A energia necessária para o funcionamento destes transportadores de NO₃⁻ é obtida indiretamente, a partir da energia potencial acumulada entre membranas biológicas gerada pela atividade das bombas de próton (P-H⁺-ATPase), as quais

são enzimas de fundamental importância no processo de absorção de NO_3^- e carregamento e descarregamento do xilema e floema.

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

2.4.1 P-H⁺-ATPase

A P-H⁺-ATPase é uma glicoproteína transmembranar com importantes funções na célula vegetal. É uma bomba eletrogênica que hidrolisa ATP para gerar energia para o movimento vetorial de H⁺ do citoplasma para o apoplasto. O gradiente de prótons assim formado gera uma força motriz que viabiliza os transportes de íons e moléculas para dentro ou fora da célula (HU-CHENG et al, 2003).

A absorção do NO_3^- é termodinamicamente desfavorável tanto em termos de gradiente de potencial elétrico (negativo dentro da célula) quanto ao gradiente de potencial químico (concentração de NO_3^- maior no interior da célula). A concentração de NO_3^- na solução do solo, que é sujeita a relevantes flutuações, encontra-se na faixa de 0,1 a 5 mM (SANTI et al., 1995). A concentração de NO_3^- no citoplasma das células radiculares expostas a nitrato foi estimada na faixa de 5 a 30 mM (KING et al., 1992). A absorção de nitrato é um processo ativo, que ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, e precisa da geração de um gradiente de próton através da membrana plasmática, sendo portanto, dependente da atividade das bombas de próton (P-H⁺-ATPase) dessas membranas (GLASS et al., 1992).

Os ácidos orgânicos dissociados no interior da célula somados à extrusão de prótons do citoplasma para o apoplasto, gera um interior eletronegativo. O acúmulo dos prótons no exterior da célula, cria um potencial, com tendência dos H⁺ a voltarem ao interior eletronegativo da célula gerando uma força próton motriz (Δp). Essa Δp energiza a entrada do NO_3^- em simporte com 2H⁺ por um transportador. Assim, o NO_3^- consegue ser absorvido contra o gradiente de potencial eletroquímico (FERNANDES & SOUZA, 2006). A P-H⁺-ATPase é uma bomba de próton que apresenta um domínio auto-inibitório, localizado na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica que atua na regulação de sua atividade. Essa regulação ocorre por fosforilação, onde é ativada pelo fosfato do ATP, mas também pode ocorrer inibição ou ativação por meio de substâncias exógenas. A fusicocina faz ativação irreversível da P-H⁺-ATPase por se ligar a proteína14-3-3, aumentando a extrusão de prótons e a conseqüente absorção de íons. O vanadato, um análogo do fosfato, promove completa inibição da extrusão de prótons e inibe a entrada de íons como o NO_3^- .

BUCHER et al. (2006) avaliando o efeito do vanadato e da fusicocina na atividade das P-H⁺-ATPase nas raízes de arroz, verificaram que o vanadato promoveu completa inibição da extrusão de H⁺ e conseqüentemente não ocorreu o influxo de K⁺. O contrário ocorreu com o uso da fusicocina, que promoveu aumento da extrusão de H⁺ e conseqüente aumento na absorção de K⁺.

Quanto à atividade das P-H⁺-ATPases na parte aérea, estas participam dos processos de carregamento e descarregamento do xilema e floema. O envio do NO_3^- para a parte aérea é dependente de energia metabólica sob a forma de ATP. As bombas de prótons da plasmalema exercem o papel de gerar gradientes eletroquímicos necessários ao transporte de nutrientes entre o xilema e o floema (SONDEGAARD, 2004).

2.5 Redução do nitrato nos vegetais

Após ser absorvido, o NO_3^- precisa ser incorporado a esqueletos de carbono, para que esteja finalmente assimilado. Sendo assim, o NO_3^- necessita ser reduzido a NH_4^+ , que pode ocorrer nas raízes ou na parte aérea. Essa conversão do NO_3^- a NH_4^+ ocorre em duas etapas.

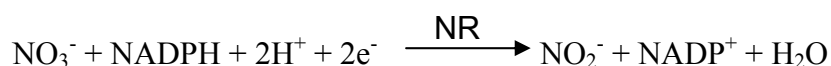
No citossol, o NO_3^- é reduzido a NO_2^- pela enzima Nitrato Redutase (NR) com gasto de 2 elétrons (é) doados pelas coenzimas NADH ou NADPH. Em seguida, o NO_2^- formado é transferido para o cloroplasto nos tecidos fotossintetizantes ou para os plastídios nas raízes, onde são reduzidos a NH_4^+ pela enzima Nitrito Redutase (NiR) com gasto de 6 é doados pela Ferredoxina reduzida (SOUZA & FERNANDES, 2006).

2.5.1 Nitrato Redutase

A Nitrato Redutase catalisa a primeira etapa de assimilação de nitrogênio em plantas superiores por meio da redução do nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) (OAKS, 1994; YANEVA et al., 2000; BATISTA, 2002). Sua atividade pode ocorrer no citoplasma tanto de raiz como de folhas (SOUZA & FERNANDES, 2006).

A NR é uma enzima passível de ativação e indução pelo substrato inicial (NO_3^-) e possui meia-vida curta (em torno de três horas). A diminuição no influxo de NO_3^- , e, portanto queda da quantidade de NO_3^- no citosol ou o acúmulo do produto final, o NH_3 pode resultar em queda da atividade da NR. A baixa atividade dessa enzima diminui os níveis de proteína solúvel, enquanto aumenta as concentrações de N- NO_3^- nos tecidos das plantas (KRAMER & BOYER, 1995; LOPES, 1998).

A atividade da Nitrato Redutase (ANR) é o passo limitante da via de assimilação de nitrato e há evidências de que há repressão de síntese quando amônio é utilizado como fonte de N ou quando há aumento na concentração interna de compostos nitrogenados orgânicos. A presença de nitrato é necessária para a síntese de NR, tendo sido demonstrado que pequenas exposições a nitrato são suficientes para sua indução e que o fluxo de nitrogênio ou o *status* de nitrogênio da planta controlam sua expressão (TISCHNER, 2000).



RODRIGUES (2001) verificou que a ANR se correlacionou inversamente com a eficiência no uso do nitrogênio. Comparando a assimilação de N e sua compartimentalização nas células radiculares de duas variedades de arroz, uma tradicional e outra melhorada, verificou que a menor atividade de NR na variedade tradicional correspondia a uma melhor eficiência no uso do nitrogênio que era acumulado para a produção de proteínas na fase reprodutiva. Monitorada simultaneamente com a Glutamina sintetase (GS), a atividade da nitrato redutase estabeleceu a eficiência na utilização fisiológica de N, medida através da produção e qualidade de proteína bruta nos grãos (SOUZA et al., 1999).

2.6 Assimilação de NH_4^+

Uma vez que o NO_3^- é reduzido a NH_4^+ , este deve ser imediatamente incorporado a esqueletos de carbono pelo sistema enzimático Glutamina, Sintetase/Glutamato Sintase (GS/GOGAT) formando compostos orgânicos, pois é um íon tóxico às plantas.

2.6.1 Glutamina sintetase, Glutamato sintase e Glutamato desidrogenase

O processo de assimilação ocorre pela via GS-GOGAT de natureza cíclica, em que o glutamato é ao mesmo tempo substrato e produto da assimilação (SOUZA & FERNANDES, 2006) (Figura 1).

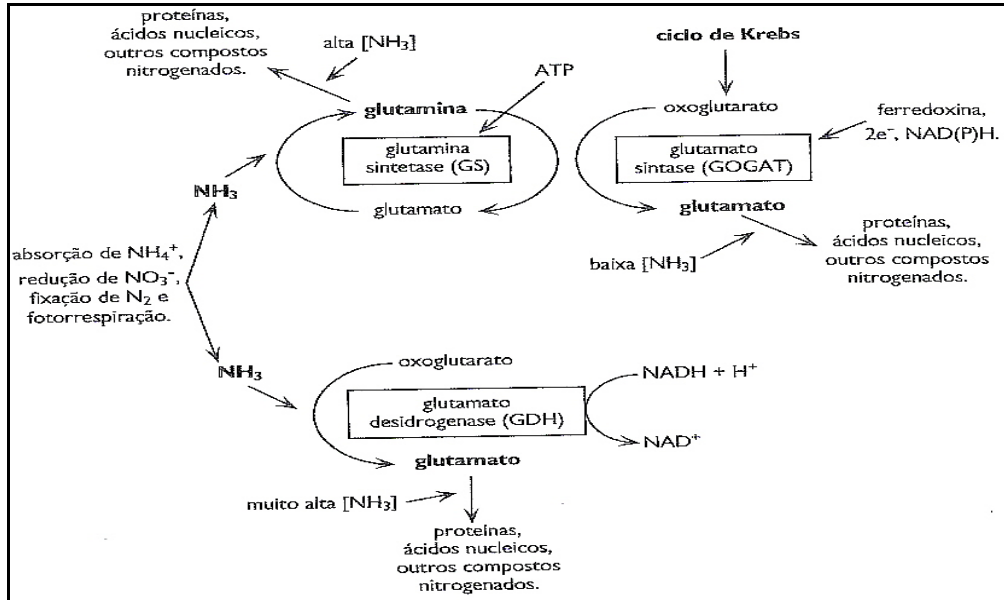


Figura 1. Esquema representativo da via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) para assimilação de amônio e atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH) (Pimentel, 2004).

O processo de assimilação se inicia pela enzima Glutamina sintetase (GS), que apresenta alta afinidade (baixo K_m) pelo substrato (NH_4^+), portanto atuando sobre baixas concentrações desse íon. Atualmente, são conhecidas duas isoformas de GS nas folhas: GS1 citossólica e GS2 plastidial (HIREL & GADAL, 1980). Quando o nitrogênio é absorvido na forma de NH_4^+ , como ele é tóxico, é assimilado logo no citossol pela GS1. Quando é absorvido como NO_3^- , este pode circular livremente pela célula, permitindo que o NH_4^+ seja formado no plastídeo ou cloroplasto, onde é assimilado pela GS2.

A Glutamina sintetase incorpora o NH_4^+ ao glutamato, aceptor inicial, usando energia fornecida pelo ATP e forma glutamina. A glutamina então formada, transfere um grupamento amino ($-\text{NH}_2$) para o α -cetoglutarato, proveniente do ciclo de Krebs, pela ação da segunda enzima, Glutamato sintase, que também apresenta alta afinidade pelo substrato, com energia fornecida pela ferredoxina reduzida- GOGAT (Fd_{red} -GOGAT) quando na parte aérea ou NADH-GOGAT quando na raiz, formando duas moléculas de Glutamato (SOUZA & FERNANDES, 2006). Uma dessas moléculas de glutamato é requerida para manutenção da assimilação de NH_4^+ , enquanto a outra molécula poderá ser exportada, e sofrerá transaminações pela ação das aminotransferases dando origem a outros aminoácidos, que por sua vez darão origem às proteínas (TISCHNER, 2000). Quando o suprimento de NH_4^+ é alto, as duas moléculas de glutamato servem como aceptores da NH_4^+ e uma molécula de glutamina deixa o sistema (MARSCHNER, 1995), pois apresenta menor relação C:N (Figura 2).

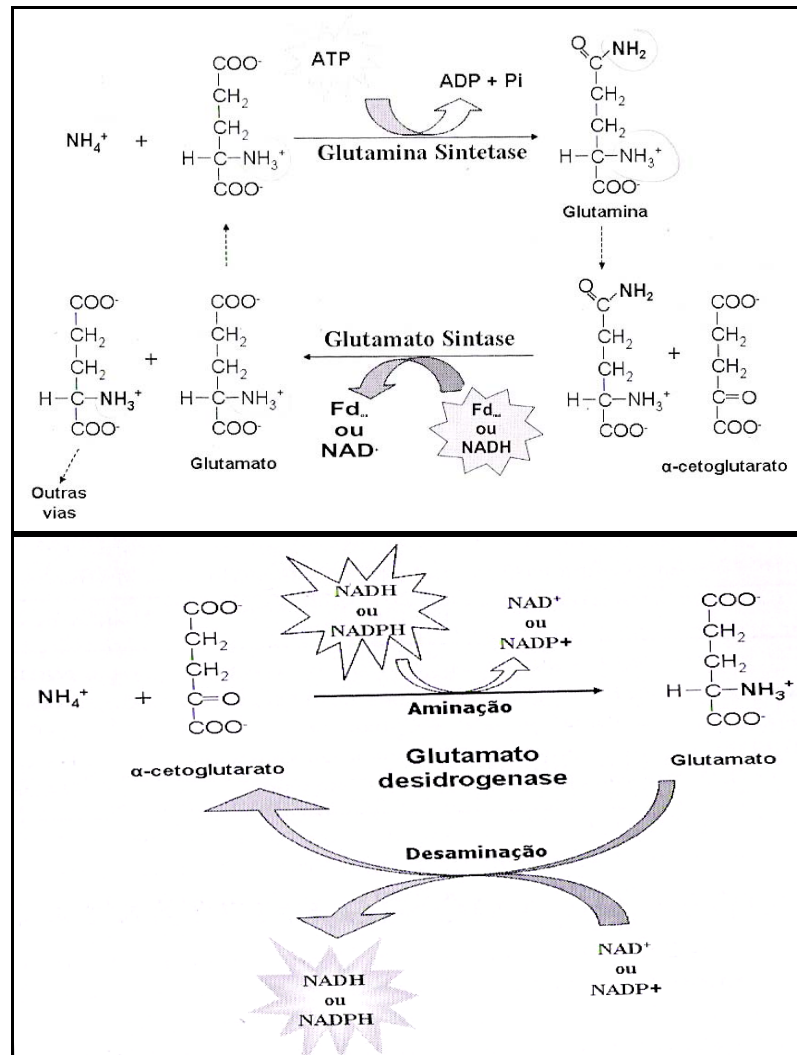


Figura 2. Esquema da via glutamina sintetase-glutamato sintase (GS-GOGAT) e atividade da enzima glutamato desidrogenase (GDH). Aminação: incorporando amônio e formando glutamato; e desaminação: catalisando a oxidação do glutamato a α -cetoglutarato, liberando amônio (Souza & Fernandes, 2006).

Quando há elevadas concentrações de NH_4^+ , entra em ação mais uma enzima, a GDH, como rota alternativa, que tem uma baixa afinidade pelo substrato (Figura 2). Só tem importância na assimilação de NH_4^+ em altíssimas concentrações na raiz (MAGALHÃES & HUBER, 1989). Apesar da Glutamato desidrogenase fazer aminação, existem fortes evidências de que a sua principal função é a desaminação do glutamato. Ela retira o grupamento amino do glutamato liberando NH_4^+ e α -cetoglutarato que pode ser direcionado ao ciclo de Krebs. O NH_4^+ então liberado é incorporado pela GS formando glutamina, estocando dois grupamentos apresentando menor relação C:N. Sendo assim, em fase de crescimento costuma-se ter maiores teores de glutamato, enquanto na fase de senescência, há predominância da Glutamina (ANDREWS et al., 2004).

2.7 Acúmulo do nitrato no vacúolo

O NO_3^- , quando sob condições de elevada disponibilidade no citossol, tem parte do seu conteúdo reduzido e assimilado, enquanto uma grande quantidade pode ser transportada para os vacúolos (compartimentos de reserva) das células de todos os tecidos da planta através de canais iônicos específicos e ser armazenado para posterior utilização (Figura 3). Isso pode ocorrer devido a situações limitantes de energia, poder redutor e esqueletos de carbono, por ocasião de ausência de luz, senescência, baixa taxa fotossintética, estresse e outros (SOUZA & FERNANDES, 2006), ou até mesmo por excesso do substrato final produzido, o NH_4^+ , que inibe a atividade da Nitrato Redutase. A entrada e saída do NO_3^- no vacúolo é regulada pela ativação ou inibição das bombas de prótons vacuolares, as V- H^+ -ATPases e H^+ -PPases presentes no tonoplasto, regulando o conteúdo e volume dos vacúolos nas células das plantas.

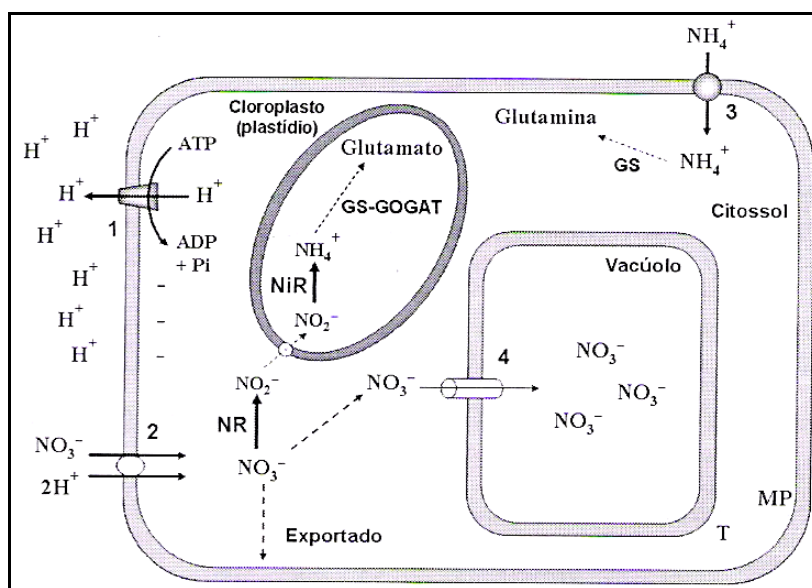


Figura 3. Visão geral da absorção de nitrato; redução, exportação e acúmulo de nitrato; assimilação de amônio. T (tonoplasto) e MP (membrana plasmática). (1) P- H^+ -ATPase; (2) transportador de NO_3^- (simporte); (3) transportador de NH_4^+ (uniporte); e (4) canal de NO_3^- (Souza & Fernandes, 2006).

Quando o NO_3^- está presente em grandes concentrações no citossol, ele funciona como um ânion caotrópico para as V-ATPases, causando um desligamento entre os domínios integral e periférico desta proteína tornando-a incapaz de hidrolisar ATP e translocar prótons, inativando a enzima (FINBOW & HARRISON, 1997). Dessa forma, as V-ATPases não funcionam quando há grandes quantidades de NO_3^- no citossol, priorizando o acúmulo deste nutriente (SANTOS, 2006a).

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

2.8 Remobilização do Nitrato Acumulado

O NO_3^- , uma vez acumulado, pode ser remobilizado do vacúolo, quando o seu conteúdo citoplasmático diminuir ou quando a planta o exigir em maiores quantidades para os processos de biossíntese na fase de crescimento vegetativo intenso ou reprodutivo, sendo disponibilizado para assimilação. Dessa forma, o vacúolo funciona como um reservatório de N-NO_3^- para sustentar os processos de crescimento em condições de deficiência desse nutriente (SANTOS, 2006a) (Figura 4).

A remobilização do nitrato do vacúolo para o citossol ocorre através de um transportador de NO_3^- , do tipo simporte, com um próton (NO_3^-/H^+) e depende do acionamento de duas bombas de prótons presentes na membrana do tonoplasto, as V-H^+ -ATPases e as H^+ -PPases que bombeiam prótons do citossol para o interior do vacúolo com uso da energia derivada da hidrólise de ATP e PPi respectivamente, criando um gradiente de potencial eletroquímico favorável à saída do H^+ (FERNANDES & ROSSIELO, 1995) (Figura 4). É freqüentemente aceito que as V-H^+ -ATPases têm papel predominante na manutenção do gradiente eletroquímico transmembrana de prótons, entretanto, as H^+ -PPases parecem servir como um sistema auxiliar no bombeamento de prótons, principalmente em tecidos mais jovens, onde a produção de PPi é mais intensa (FAÇANHA & MEIS, 1998).

A acidificação de compartimentos intracelulares por uma bomba protônica tipo-V (V-H^+ -ATPase) é responsável pela energização do transporte de outros íons e metabólitos (PADMANABAN et al., 2004).

2.8.1 V-ATPase Vacuolar

A V-H^+ -ATPase é a proteína mais abundante no tonoplasto (membrana vacuolar), ocorrendo na faixa de 6,5 a 35% do total de proteínas presentes no tonoplasto de diferentes espécies de plantas (RATAJCZAK, 2000).

Esta enzima é composta de dois domínios estruturais. O domínio periférico (V_1) é um complexo de 640 kDa responsável pela hidrólise de ATP e contém oito diferentes subunidades (A-H) de massa molecular entre 13 e 70 kDa com a estequiometria $\text{A}_3\text{B}_3\text{CDEFG}_2\text{H}_{1-2}$. O domínio integral (V_o) é um complexo de 260 kDa responsável pela translocação de prótons e é composto de cinco subunidades (a, b, c, c', c'') com massa molecular entre 17 e 100 kDa na estequiometria $\text{abc}'\text{c}''\text{c}_4$ (KAWASAKI-NISHI et al., 2003). O domínio periférico V_1 é responsável pela hidrólise de ATP, enquanto que o domínio integral responsável pela translocação de prótons.

Esta bomba protônica é responsável pela acidificação do interior vacuolar, pelo bombeamento de H^+ do citossol para o vacúolo, com uso da energia liberada durante a hidrólise do ATP, criando, portanto, um gradiente de potencial eletroquímico, e a força próton motriz para uma variedade de eventos de transporte de íons e metabólitos, assim como para remobilização do NO_3^- acumulado (Figura 4).

O pH ótimo para a atividade das V-H^+ -ATPases está na faixa de 7,5 a 8,0 e pode ser estimulada pelo ânion cloreto (Cl^-) e são sensíveis ao nitrato (SANTOS, 2006a).

As V-H^+ -ATPases não funcionam quando há grandes quantidades de NO_3^- no citossol, priorizando desta forma o acúmulo deste nutriente. Quando há necessidade de remobilizá-lo, estas bombas são acionadas.

2.8.2 H^+ -PPase Vacuolar (Pirofosfatase)

As pirofosfatases vacuolares são bombas protônicas presentes no tonoplasto e apresentam a mesma função das P-H^+ -ATPase e V-H^+ -ATPase de bombear prótons criando um gradiente eletroquímico, porém a energia utilizada para bombear o próton prove do PPi e

não do ATP como das outras bombas de prótons (Figura 4). O PPI é um subproduto de vários processos metabólicos, como polimerização de DNA e RNA, síntese de aminoacil-tRNA, formação de ADP-glicose e UDP-glicose entre outras (MAESHIMA, 2000). Essa enzima é mais utilizada em fase de crescimento intenso, onde há grandes processos de biossíntese com liberação de muito PPI. Assim, esta enzima reaproveita esses PPI liberados, para bombear prótons, economizando ATP que está sendo “disputado” para síntese de novas moléculas e outros processos metabólicos. Estas bombas, juntamente as V-ATPase, regulam a entrada e saída do nitrato nos compartimentos de reserva (vacúolos) (SANTOS, 2006a).

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

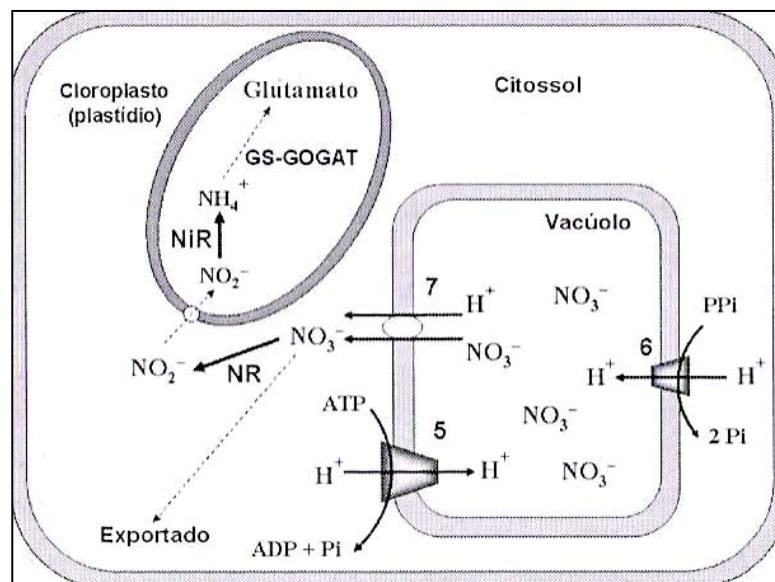


Figura 4. Visão geral da remobilização de nitrato do vacúolo. (5) V- H^+ -ATPase; (6) H^+ -PPase; (7) transportador de NO_3^- (simporte: H^+ / NO_3^-) (Souza & Fernandes, 2006).

2.9 Proteína bruta e frações protéicas dos grãos de arroz

As proteínas provenientes dos grãos de cereais correspondem a mais que a metade da produção de proteína total no mundo (LÁSZITITY, 1986).

A proteína do grão de arroz é constituída de quatro frações diferentes: Albumina + Globulina, Prolamina e Glutelina, presentes com teores que variam de 3-30,9%, 1,6-20,6% e 55-88,1%, respectivamente (JULIANO, 1985; LÁSZITITY, 1986). A classificação de Osborne's (1907) é utilizada até hoje para a separação de proteínas de acordo com a sua solubilidade. Segundo este autor, a albumina é solúvel em água, a prolamina em solução alcoólica, a globulina em solução salina e a glutelina em solução alcalina.

O arroz contém comumente baixo teor de proteína no grão variando de 5,3 a 7,7%, porém existem variedades com alto teor protéico, que variam de 8 a 12,3%, podendo chegar a 15% (JULIANO, 1985). Apesar de seu menor teor de proteína no grão em comparação com outros cereais, o arroz apresenta uma proteína relativamente de melhor qualidade. O arroz

apresenta como principal proteína de reserva, a glutelina, enquanto que nos outros cereais, é a prolamina. A maior parte da glutelina se encontra no endosperma, já a albumina e a globulina estão concentradas no embrião e camada de aleurona, enquanto que a prolamina se distribui mais uniformemente pelo grão (LÁSZITITY, 1986). Como cerca de 83% da glutelina do grão está concentrada no endosperma, após o beneficiamento do arroz, o seu valor protéico é conservado, pois esta camada não é removida, como acontece com a camada de aleurona e o embrião, depois do beneficiamento (TECSON, 1971).

A qualidade nutricional dos grãos de arroz é determinada principalmente pelo teor de proteína bruta (PB) (DECKARD, 1994), pois como observado por SOUZA et al. (1993) e ARAÚJO et al. (2003), o aumento do teor de proteína bruta é acompanhado por um aumento da fração glutelina, portanto, aumentando a qualidade do grão.

Quando o nível de N disponível no solo é limitante à produção de grãos de uma cultivar, o teor de PB aumenta a custo da redução da produção de grãos. Logo, para produzir arroz com elevado teor de PB, sem reduzir a produtividade, é preciso aumentar o fornecimento de N, o que eleva os custos de produção. Sendo assim, o aumento da produtividade do arroz e da qualidade nutricional a um baixo custo, necessita de um aumento da EUN por este cereal (FERRAZ JUNIOR, 1993). E essa combinação de altas produções e altos teores de proteína bruta nos grãos pode ser alcançada em variedades tradicionais que apresentam eficiência no uso de nitrogênio disponível (SHERRARD et al., 1984). No entanto, as condições ambientais podem afetar a produção e teor de proteína nos grãos de arroz. FERRAZ JUNIOR et al. (2001) avaliando 10 variedades tradicionais de arroz do Estado do Maranhão, classificadas como variedades de alto teor de proteína bruta, observaram uma correlação negativa entre a porcentagem de proteína bruta e a produção de grãos em Seropédica. Esses autores encontraram baixo teor de proteína bruta em relação ao cultivo no Maranhão, ocorrido devido a maior intensidade luminosa em Seropédica do que no Maranhão, a qual favoreceu a produção de grãos e a redução dos teores de proteína. Já no Maranhão, a baixa insolação favoreceu o acúmulo de N-amino livre nas folhas, o qual reduziu a disponibilidade de esqueleto de carbono para produção de matéria seca e aumento de substrato para proteína, enchimento de grãos, com conseqüente redução de produção de grãos e aumento de proteína bruta.

As proteínas armazenadas nos grãos contribuem para o processo de germinação das sementes garantindo a perpetuação das espécies. Assim, sob condições onde a energia é o fator limitante, as proteínas podem ser realmente produzidas em detrimento da produção de matéria seca dos grãos. A síntese de proteína e a síntese de amido são processos que apresentam um requerimento diferencial quanto à energia fotossintética. A síntese protéica requer aproximadamente o dobro da energia requerida para a síntese do amido. O requerimento de energia para síntese de cada fração protéica do grão de arroz é diferenciado. A fração albumina + globulina, apresenta maior requerimento de energia por conter maior teor de aminoácidos essenciais, seguido pela glutelina que tem teor de aminoácido essencial intermediário e a prolamina que apresenta o menor requerimento de energia. Essas diferenças de energia de produção poderiam ser responsáveis pelo acúmulo diferencial das frações protéicas dos grãos em relação ao N aplicado (SOUZA, 1995). Como no arroz a principal proteína de reserva é a glutelina, o armazenamento de N nesta fração protéica requer maior disponibilidade de energia, em relação aos outros cereais, que talvez tivesse que ser usada à custa da redução da produção de matéria seca dos grãos (SOUZA, 1990). Sendo assim, geralmente o peso dos grãos e a produção de proteína bruta apresentam relação negativa.

A época de aplicação do nitrogênio extra também influencia a via metabólica para síntese de amido ou de proteína nos grãos. De acordo com SMITH et al. (1989), a aplicação de N em período próximo, mas anterior à antese, favorece o aumento do peso de grãos induzindo a síntese de amido. Porém, com aplicações tardias de nitrogênio, os grãos agiram

como principal dreno para o nitrogênio extra aplicado, favorecendo a síntese de proteína e conseqüentemente a acumulação de proteína no grão. Desta maneira, a época de aplicação de N influencia no direcionamento do metabolismo para produção de matéria seca dos grãos ou para a produção de proteína nos mesmos.

O aumento da proteína no grão é acompanhado por um insignificante aumento no crescimento vegetativo (TURLEY & CHING, 1986), que talvez seja apenas o necessário para manter certo nível de fotossíntese compatível com a demanda de esqueletos de carbono, tanto a biossíntese de aminoácidos quanto para o fornecimento de energia para redução de nitrogênio aplicado (SOUZA, 1990).

Para a síntese de proteína de reserva no grão, o nitrogênio é mobilizado das reservas vegetativas acumuladas antes da antese e do nitrogênio absorvido durante o desenvolvimento dos grãos (PATE, 1980).

Como a quantidade de nitrogênio que pode ser absorvida durante o período de amadurecimento é muito pequena comparada ao requerimento de nitrogênio do grão, maior quantidade de nitrogênio é translocado das folhas para os grãos, com o avanço do amadurecimento (WADA et al., 1986).

Segundo PEREZ et al., 1973, em arroz, no estágio vegetativo as lâminas foliares têm geralmente mais nitrogênio que as bainhas + colmo. Durante o desenvolvimento do grão, entretanto, o nitrogênio das lâminas foliares decresce, enquanto o N das bainhas + colmos permanecem essencialmente constante, indicando que as folhas são as principais fontes de N translocado para os grãos em desenvolvimento. Isto porque o nitrogênio absorvido pelas raízes durante a fase de enchimento do grão, não é suficiente para suprir as necessidades de desenvolvimento das sementes.

2.10 Fatores que influenciam o enchimento dos grãos

A panícula é a inflorescência da planta de arroz. Essa estrutura abriga as flores e posteriormente as espiguetas. Dependendo do tipo e intensidade de estresse a que a cultura pode ser submetida na fase de seu desenvolvimento reprodutivo, as panículas não completam seu desenvolvimento, formando “panículas brancas”. Esse termo, panícula branca, é usado para se referir as panículas que não apresentaram grãos cheios em toda a sua extensão, originando “grãos chochos”. A formação de panículas brancas em uma lavoura, resulta de vários tipos de estresses que podem ser originados de fatores bióticos ou abióticos. Dentre os fatores bióticos citam-se os insetos e doenças, e os abióticos são caracterizados principalmente pela deficiência hídrica, temperaturas extremas e fitotoxidez causada por herbicidas. Quando o estresse ocorre na ocasião da sua emissão, as panículas morrem e tornam-se brancas, permanecendo eretas (BARRIGOSSI et al., 2004).

2.10.1 Fatores Bióticos

A. Broca do Colmo

As lagartas de *Diatraea saccharalis* (Figura 5a) penetram nos colmos das plantas e passam a se alimentar do tecido esponjoso abrindo uma galeria. Quando o ataque se dá nos internódios superiores, logo após o florescimento, ocorre morte das panículas, que se tornam brancas e permanecem eretas (Figura 5b). Nesse caso, a morte da panícula é resultado da alimentação da larva que impede a translocação de assimilados essenciais para o enchimento das espiguetas. Quando o ataque ocorre na fase vegetativa das plantas, a parte central do colmo atacado é seccionada e resulta no sintoma conhecido como coração morto (BARRIGOSSI et al., 2004).



Figura 5. (A). Larva de broca-do-colmo, *Diatraea saccharalis*; (B). Panículas vazias (Barrigossi et al., 2004).

B. Percevejo-do-Colmo

O percevejo *Tibraca limbativentris* (Figura 6), para se alimentar, introduz o seu rostro no colmo das plantas de arroz, provocando um estrangulamento do colmo, como ocorre com o ataque da broca. Quando o ataque se dá na fase vegetativa da cultura, antes da formação do primórdio floral, resulta na morte da parte central do colmo, geralmente provocando o sintoma de coração morto. Na fase reprodutiva, porém ocorre a formação de panícula parcial ou totalmente branca. Ao se examinar o colmo atacado observa-se somente o ponto de estrangulamento no local de alimentação do percevejo (BARRIGOSSI et al., 2004).

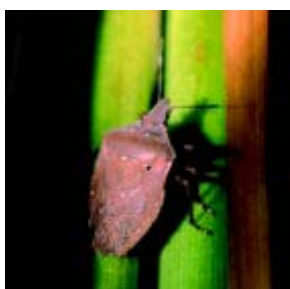


Figura 6. Adulto do percevejo-do-colmo, *Tibraca limbativentris* (Barrigossi et al., 2004).

2.10.2 Fatores Abióticos

A. Temperatura

A temperatura crítica, máxima ou mínima, determina o ambiente no qual o ciclo de vida da planta de arroz pode se completar. Temperaturas extremas, quando coincidem com a fase de maior sensibilidade das plantas, mesmo que por curtos períodos, podem causar esterilidade das espiguetas. A esterilidade pode se dar em poucas espiguetas ou até na panícula inteira. Sob alta temperatura, a cultura é mais suscetível nas fases de emissão de panícula e de emborrachamento. À medida que a temperatura ultrapassa 35°C, a viabilidade do grão de pólen pode ser afetada. Quanto mais alta a temperatura e mais prolongado o tempo de exposição no dia do florescimento, maior será a esterilidade. Variedades sensíveis, expostas por duas horas à temperatura de 41°C, podem ter sua fertilidade reduzida em até 80% nas espiguetas que se abrirem nesse intervalo. Temperaturas muito altas antes ou depois do florescimento, têm pouco efeito na esterilidade. Sob baixa temperatura, a sensibilidade da cultura é maior no emborrachamento, aproximadamente 11 dias antes do florescimento. Se ocorrerem aproximadamente dez dias antes da floração, baixas temperaturas induzem

esterilidade, mas seu efeito é menos severo quando ocorrerem na diferenciação das espiguetas, isto é, 24 dias antes da floração. A temperatura crítica para a fertilização varia entre 15 e 19°C. O efeito da temperatura noturna na esterilidade floral é menos significativo se a temperatura diurna for alta. Diferenças varietais são conhecidas com relação a resposta à baixa temperatura. Em variedade susceptível, a fertilização cai para 80% se a temperatura permanecer entre 17-20°C, durante quatro dias (BARRIGOSSI et al., 2004).

B. Deficiência Hídrica

A manutenção da umidade do solo na ocasião da floração é essencial para o desenvolvimento das panículas e formação das espiguetas. A ocorrência de veranico nessa fase de desenvolvimento das plantas de arroz apresenta um efeito negativo que será mais intenso se as plantas apresentarem maior massa foliar, visto que a reserva de água do solo será consumida mais rapidamente. A deficiência hídrica nos tecidos vegetais resulta no dessecamento parcial ou total das espiguetas. Os efeitos do estresse hídrico são mais expressivos se coincidirem com períodos de altas temperaturas do ar e ocorrência de ventos, pois juntos contribuem para elevar a taxa evapotranspiratória do sistema solo-planta. Mesmo em cultivos sob irrigação por aspersão, não é rara a ocorrência de formação de panículas brancas devido ao fornecimento insuficiente ou má distribuição da lâmina d'água no campo de produção, no período de floração. Apesar de serem mais comumente observadas em arroz de terras altas, particularmente nas regiões pouco favorecidas pelo regime de chuvas, panículas brancas também podem ocorrer em cultivos irrigados de arroz de várzeas. Para algumas variedades, a manutenção do solo úmido não é suficiente para que ocorra o normal desenvolvimento das panículas, sendo necessária a manutenção da lâmina d'água (BARRIGOSSI et al., 2004).

C. Combinação de fatores

A planta de arroz pode sofrer com mais de um tipo de estresse no mesmo período. Quando a injúria é imposta na fase de emborrachamento, mas não em intensidade suficiente para impedir a emissão da panícula, espiguetas resultantes dessas panículas são mal formadas, parcialmente descoloridas (Esses sintomas estão relacionados com ação moderada de traumatismos nos colmos e forte insolação) (BARRIGOSSI et al., 2004).

2.11 Eficiência no Uso de Nitrogênio (EUN)

A principal limitação quanto ao uso do arroz na alimentação da população de baixa renda, é o baixo teor de proteína total nos grãos, que está em torno de 7% (BRESSANI et al., 1971; NALIVKO et al., 1975), entretanto sua proteína é de boa qualidade nutricional quando comparada à do milho, cevada e trigo.

Depois de carbono, oxigênio e hidrogênio, o nitrogênio é quantitativamente o mais importante elemento requerido por plantas e animais para o crescimento e aumento de produção (VAN LOON & DUFFY, 2001). Esse nutriente é essencial para obtenção de grãos de alto valor nutritivo.

Desta forma, esse nutriente foi um dos que mais contribuiu para a chamada Revolução Verde. Com abundância e baixo custo do petróleo e de adubos nitrogenados, o nitrogênio foi excessivamente utilizado associado a plantas que respondessem à adubação, com intuito de se obter elevada produtividade. Devido a seu uso indiscriminado trouxe consigo problemas ambientais (BOUCHARD et al., 1992). Grande parte dos fertilizantes aplicados às culturas, lixivia para águas subterrâneas ou volatiliza para atmosfera, não apenas desperdiçando um

recurso valioso, mas também colocando em risco a saúde humana (EPSTEIN & BLOOM, 2006).

Com a crise do petróleo, somado aos problemas ambientais reduziu-se o uso de nitrogênio e o ideotipo de plantas que respondessem á adubação nitrogenada não era mais indicado. Na tentativa de minimizar os problemas ambientais, sem prejuízo da produtividade, além de reduzir os custos com fertilizantes nitrogenados, tem-se selecionado novas variedades de plantas mais eficientes no uso do nitrogênio (EUN) (MANN, 1997).

A EUN torna-se especialmente importante para a produção de cereais, onde são consumidos 60% do total de nitrogênio fertilizante utilizado no mundo e recupera-se, em média, apenas 33% de todo o N nos grãos (RAUN et al., 2002).

SOUZA et al. (1998) verificaram que variedades de arroz tradicionais (locais do Maranhão) são mais eficientes na utilização do N acumulado e, portanto menos dependentes de suplementação externa desse nutriente na fase reprodutiva do que as variedades melhoradas.

Essas variedades tradicionais apresentam uma grande variabilidade genética sendo importante nos programas de melhoramento (FONSECA et al., 1982), na obtenção de maior eficiência no uso de nitrogênio e tolerância a estresses ambientais adversos. Uma vez que sob condições limitantes de nutrientes e água, essas plantas desenvolveram mecanismos de adaptação a este ambiente passando a usar de forma mais eficiente os recursos disponíveis, dentre eles o nitrogênio, permitindo-lhe a sobrevivência e perpetuação da espécie. Sendo assim, essa adaptação, que para a planta, é uma forma de conseguir N suficiente para produzir sementes com altos teores de proteínas e carboidratos de reserva para garantir a perpetuação da espécie, para o homem, é sinônimo de redução de custos de produção e de poluição, e de obtenção de altos teores de proteína nos grãos para alimentação humana.

Pesquisadores têm estudado quais os mecanismos envolvidos nessa eficiência. Sendo assim, a busca da maior eficiência em seu uso (EUN), através do conhecimento das vias bioquímicas e moleculares de absorção e assimilação em plantas, são propostas para permitir o uso sustentável deste elemento sem a perda da produção (TRAORE & MARANVILLE, 1999; PRADELLA et al., 2001).

O estudo da eficiência no uso de N permite vislumbrar vários caminhos, desde os mais simples, que se baseiam na simples diminuição das doses de adubos até certo ponto, de modo a manter níveis satisfatórios de produção das culturas, até aqueles que via melhoramento genético são capazes de criar plantas produtivas em solos pobres em N (MAJEROWICZ et al., 2002).

Para se identificar os genótipos e as estratégias de manejo mais eficientes no uso de N também são necessários experimentos em campo, observando inúmeras culturas. Deve-se avaliar a absorção, assimilação, estocagem e mobilização de N no decorrer do crescimento e desenvolvimento da planta, explorando a melhor época de aplicação e a partição deste fertilizante (RAUN & JOHNSON, 1999).

Sistemas complexos de absorção, assimilação e remobilização evitam o desperdício de energia e resultam de uma adaptação progressiva das plantas aos ambientes de baixo suprimento de N (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995).

RODRIGUES et al. (2004) trabalhando com duas variedades de arroz, uma tradicional (Piauí) e outra melhorada (IAC-47), verificaram que a cultivar Piauí apresentou elevada capacidade em armazenar o N absorvido no estágio inicial de crescimento e remobilizá-lo no final do ciclo para síntese de proteína nos grãos, aparentemente, apresentando uma elevada eficiência no uso de nitrogênio quando comparada com a IAC-47. Este resultado indica que as variedades tradicionais desenvolveram mecanismos que as tornaram mais eficientes na aquisição e uso deste nutriente resultando em teores e qualidade de proteína nos grãos superiores aos encontrados nas variedades melhoradas.

A capacidade de rápido acúmulo de NO_3^- na fase inicial de crescimento pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo de vida, principalmente quando do enchimento dos grãos, e podem ser a razão do alto acúmulo de N nos grãos. A maior eficiência de aquisição de NO_3^- , a partir de baixas concentrações na solução externa pode ser uma indicação de adaptação às condições de estresse nutricional (fluxos instáveis de N), como o decorrente da disponibilidade sazonal de NO_3^- em regiões tropicais (SANTOS, 2006b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condições experimentais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) situada na BR 465, km 7 do município de Seropédica/RJ a 22°45' de latitude Sul e 43°41' de longitude Oeste. Teve início no final do mês de Agosto de 2006, por apresentar um clima mais ameno, o que proporciona melhores condições para o desenvolvimento das plantas de arroz (Figura 7a).



Figura 7. (A) Casa de vegetação do Deptº de Solos do Instituto de Agronomia, na qual foi conduzido o experimento. (B) Sementes das variedades Piauí e IAC-47.

Para estudar a dinâmica do N-NO_3^- durante todo o ciclo da planta de arroz, foram utilizadas sementes de duas variedades de arroz (*Oryza sativa* L.), distintas quanto ao processo de seleção: A variedade Piauí tradicional do Estado do Maranhão – cultivada por agricultores familiares, que aparentemente apresenta eficiência no uso de nitrogênio; e a variedade IAC-47 melhorada – desenvolvida por instituições de pesquisa para responder á adubação nitrogenada (Figura 7b).

As variedades foram cultivadas em vasos contendo terra peneirada sem suplementação de nitrogênio e suplementada com nitrogênio na forma nítrica (NO_3^-).

3.2 Germinação

As sementes foram submetidas a um tratamento com hipoclorito de sódio a 2% por 20 minutos em um agitador e depois, lavadas com água destilada em abundância para retirada completa do hipoclorito. Em seqüência, foram postas para germinar em potes contendo água destilada, utilizando uma gaze como suporte para impedir a imersão das mesmas, a qual foi presa com elástico em um pote furado e este foi imerso em outro pote maior contendo a água. Posteriormente, foram levadas para câmara de crescimento (Figura 8).

Aos 5 dias após a germinação (DAG), a água dos vasos foi substituída por uma solução de Hoagland com $\frac{1}{4}$ da força iônica (FI) (FERNANDES, 1983 e 84) e os vasos foram levados para casa de vegetação para aclimação.



Figura 8. Germinação das sementes de arroz em potes contendo água destilada e gaze.

3.3 Transplântio

Aos 10 DAG, as plântulas foram transferidas para os vasos com terra de forma a deixar cinco plantas por vaso, realizando-se o desbaste para duas plantas um mês após o transplântio (Figura 9). Os vasos de 8L foram pintados com tinta esmalte sintética alumínio com intuito de impedir a passagem de luz para evitar o surgimento de algas. O substrato utilizado foi terra proveniente dos primeiros 20 cm de um Chernossolo coletado na Vila Kennedy, município do Rio de Janeiro, peneirado em malha de 8 mm, que apresentou as seguintes características: pH 6,0; C 1,62%, P 240 e K 126 (mg l^{-1}); Na 0,135, Ca 6,3, Mg 4,1, K 0,32, H+Al 2,6, Al 0,0, S 10,86 e T 13,46 ($\text{Cmol}_c \text{dm}^{-3}$); V 81, m 0 e n 1 (%). Escolheu-se este substrato por ser de boa fertilidade.



Figura 9. Transplântio das plântulas para os vasos aos dez dias após a germinação.

3.4 Condução do experimento

Foram utilizados 48 vasos dispostos ao acaso no chão da casa de vegetação. Semanalmente foi realizado o rodízio aleatório dos vasos, para diminuir os efeitos microclimáticos, visando maior homogeneidade entre os tratamentos.

Aos 15 dias após o transplântio (DAT), aplicou-se $150 \text{ kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$ ($0.63 \text{ g N.vaso}^{-1}$), na forma de nitrato de potássio KNO_3^- na metade das plantas das variedades, tradicional e melhorada, obtendo os seguintes tratamentos:

1. Piauí sem adubação
2. Piauí com $150 \text{ kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$
3. IAC-47 sem adubação
4. IAC-47 com $150 \text{ kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$

3.5 Delineamento experimental

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com arranjo fatorial 2x2x4, constituído por duas variedades de arroz, Piauí (tradicional) e IAC-47 (melhorada), duas doses de NO_3^- , 0 e 150 $\text{kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$ e quatro épocas de coleta, aos 35 DAT, 15 e 30 dias após a antese (DAA) e coleta final de grãos e palha, com três repetições. Foi realizada uma coleta final dos grãos.

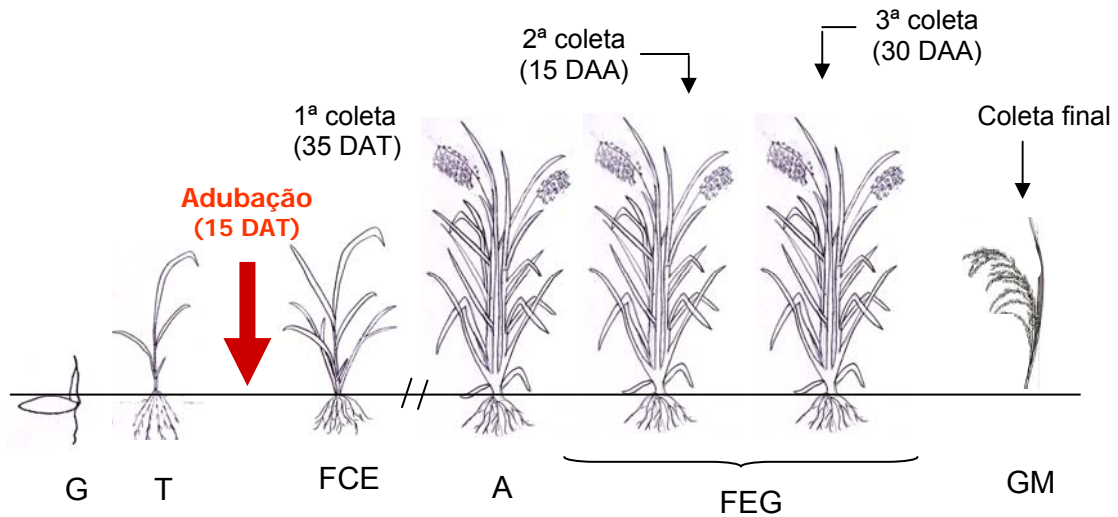


Figura 10. Esquema representativo do experimento conduzido com duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) desde a germinação até a coleta final dos grãos. G: Germinação; T: Transplântio; FCE: Fase de Crescimento Exponencial; A: Antese; FEG: Fase de Enchimento dos grãos; GM: Grãos Maduros.

3.6 Condições de cultivo das plantas

Diariamente foram medidas as temperaturas máximas e mínimas, a umidade relativa e a intensidade luminosa com o uso de um termômetro de temperatura máxima e mínima, termohigrômetro e um radiômetro, respectivamente. As leituras foram feitas às 9, 12 e 15 hs (Figura 11).

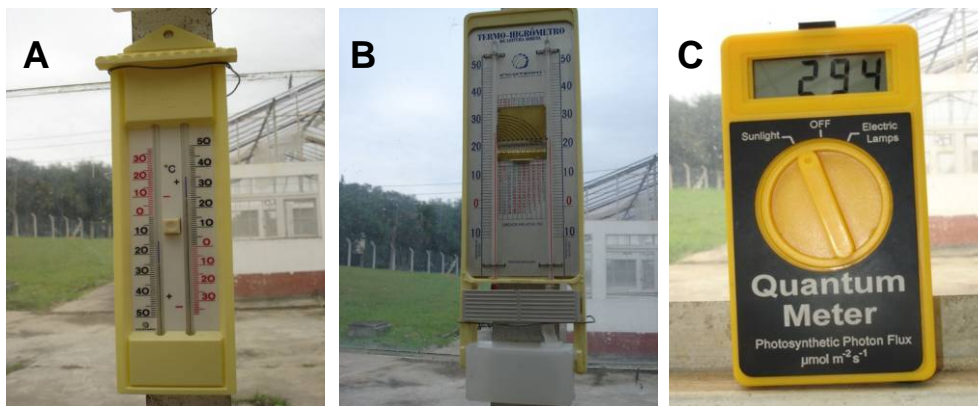


Figura 11. (A) Termômetro para medir temperaturas máxima e mínima; (B) Termohigrômetro para medir umidade relativa; (C) Radiômetro para medir a intensidade luminosa.

3.7 Coletas e análise do material seco e fresco

As coletas foram realizadas aos 35 DAT, 15 e 30 DAA, e fase final de grãos maduros, em épocas com intensidade luminosa acima de $800 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, pois as plantas C_3 saturam a intensidades em torno de 600 a $800 \mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (HALL & RAO, 1994), ocorrendo máxima atividade fotossintética, havendo, portanto, homogeneidade entre os tratamentos.

A parte aérea de cada planta foi cortada rente ao solo e separada em folha e bainha+colmo na primeira coleta e em folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo na segunda e terceira coleta (Figura 12). Ao atingirem a maturação, as plantas com suas panículas foram coletadas e também divididas em quatro partes como na 2ª e 3ª coleta, porém somente para determinação de N-total e quantificação dos teores de proteínas nos grãos. Na primeira coleta, todas as folhas foram coletadas juntas e nas figuras respectivas nos resultados são chamadas de folhas inferiores. Folhas inferiores são todas as folhas com exceção da folha 2 e folha bandeira de cada perfilho.

A cada coleta, as amostras foram pesadas obtendo-se a massa fresca. Separou-se 0,2 g para determinar a atividade da Nitrato Redutase, 0,5 g foram homogeneizadas em etanol 80% para conservar as frações solúveis para futuras análises e outros 0,5 g foram congelados em N líquido para posterior determinação da atividade da Glutamina Sintetase. Amostras de 2 a 5 gramas do material foram coletadas para fracionamento de vesículas de membrana plasmática e tonoplasto e posterior análise da atividade das $P\text{-H}^+\text{-ATPase}$, $V\text{-H}^+\text{-ATPase}$ e $H^+\text{-PPases}$. O restante do material vegetal foi posto para secar imediatamente, por 72 horas, em estufa de circulação forçada de ar à 60°C . Do material seco, foram determinados os teores de N-total.



Figura 12. Fotografia de planta de arroz nas três épocas de coleta. (A). Primeira coleta aos 35 dias após o transplântio (DAT); (B). Segunda coleta aos 15 dias após a antese (DAA); e (C). Terceira coleta aos 30 dias após a antese (DAA).

3.7.1 Atividade da Enzima Nitrato Redutase (NR)

A atividade da NR foi determinada segundo JAWORSKI (1971). Pesou-se 0,2 g de massa fresca de cada fração da parte aérea e incubou-se em tubos de ensaio com 5 ml da solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,5; n-propanol e KNO_3 . Os tubos foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria a 30°C por 60 minutos. Após os 60 min, retirou-se o tubo do banho-maria e em outro tubo adicionou-se: 0,4 mL de solução problema do tubo anterior que estava em banho-maria; 0,3 mL de sulfanilamida 1%; 0,3 mL de n-naftil-etilendiamino (0,02%). Após repouso de 20 minutos, adicionou-se 4 mL de água destilada e foi feita a leitura em 540 nm no espectrofotômetro. A atividade foi calculada a partir da leitura de absorção contra uma curva padrão de NaNO_3 nas seguintes concentrações de 0, 5, 10, 20, 25, 40 e 50 mM.

3.7.2. Frações solúveis

Do material armazenado em etanol 80%, realizou-se a partição com clorofórmio, segundo FERNANDES (1983), na qual as amostras foram maceradas com etanol 80% e filtradas em gaze e papel filtro. Em seguida, o filtrado foi transferido para um funil de separação, adicionando-se igual volume de clorofórmio, agitando suavemente e deixando, em seguida, em repouso por no mínimo 40 minutos, até obter separação da parte polar da apolar. A fase apolar foi descartada e o volume da parte polar foi completado até 25 ml com etanol 80% e armazenado em freezer para análises posteriores das frações solúveis, conforme descrito a seguir:

- **Nitrato (NO_3^-)**

A determinação do teor de nitrato foi realizada, segundo CATALDO et al. (1975), onde uma alíquota de 0,1 ml da solução estoque do extrato alcoólico de cada fração da parte aérea, foi retirada e adicionada em tubos, seguida da adição de 0,4 ml da solução de ác. salicílico a 5% em HCL concentrado, com posterior agitação. Após 20 minutos, a reação foi paralisada com adição de 9,5 ml de NaOH 2 N. Procedeu-se então a leitura do material em espectrofotômetro a 410 nm. Os resultados foram confrontados com os de uma curva de calibração padrão de solução de NO_3^- (3,611 g de KNO_3 /100ml água destilada) nas seguintes de 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 e 12 $\mu\text{g NO}_3^-/0,1\text{ml}$.

- **Amônio (NH_4^+)**

Os teores de amônio foram determinados pelo método colorimétrico, segundo FELKER (1977). Pipetou-se 0,5 ml do extrato alcoólico de cada fração da parte aérea em tubos e adicionou-se 2,5 ml da solução de Fenol com Nitroprussiato de sódio e 2,5 ml da solução de NaOH com Dicloroisocianurato de sódio. Em seguida, agitou-se e após 30 minutos procedeu-se com a leitura em espectrofotômetro a 630 nm de absorvância. Os resultados foram confrontados com os de uma curva de calibração padrão de solução de NH_4Cl (0,02674 g $\text{NH}_4\text{Cl}/100$ ml água destilada), nas seguintes de 0, 10, 20, 40, 50, 80 e 100 nmoles de $\text{NH}_4^+/0,5$ ml.

- **Açúcares solúveis**

Os açúcares solúveis foram quantificados, segundo YEMM & WILLIS (1954), no extrato alcoólico de cada fração da parte aérea, onde uma alíquota de 0,01; 0,05 ou 1,00 mL foram retiradas (de acordo com a avaliação prévia do material, completando o volume quando necessário a 1 ml) e adicionadas a tubos que já continham 5 ml do reagente de antrona, sendo a mistura deixada a 0°C por 5 minutos. Logo em seguida foram agitadas suavemente e colocadas em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Após desenvolvimento da cor verde, as amostras foram esfriadas em água corrente e lidas em espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram confrontados com os de uma curva de calibração padrão, feita de solução de glicose (50mg glicose/50ml água destilada) nas seguintes de 0, 10, 20, 40, 50, 80 e 100 μg Glicose/ml.

- **N-amino livre**

As concentrações de N-amino livre foram determinadas, segundo YEMM & COCKING (1955). No extrato alcoólico de cada fração da parte aérea, onde uma alíquota de 0,5 ou 0,1ml foi retirada (de acordo com a avaliação prévia do material) e adicionada em tubos de ensaio

contendo 0,5 ml de tampão citrato 0,2 M pH 5,0. Em seguida, acrescentou-se 1,2 ml do reagente ninidrina. Os tubos permaneceram em banho-maria a 100°C por 15 minutos, sendo em seguida resfriados em água corrente, e adicionados 3 ml de etanol 60% e procedida leitura em espectrofotômetro a 570 nm. Os resultados foram confrontados com os de uma curva de calibração padrão de solução de aminoácido leucina (0,0262g leucina/100ml água destilada), nas seguintes de 0, 0,004, 0,008, 0,012, 0,016 e 0,024 mM de leucina.

3.7.3 Atividade das Enzimas P-H⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e H⁺-PPases

Amostras de 5 a 10 gramas de cada fração da parte aérea foram coletadas e submetidas ao fracionamento de vesículas de membrana plasmática e tonoplasto. Posteriormente, realizou-se a análise da atividade das P-H⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e H⁺-PPases, utilizando metodologias propostas por SANTOS (2006a).

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

- **Isolamento de Vesículas de Plasmalema e Tonoplasto**

Todo o processo descrito para o isolamento das vesículas foi realizado entre 0 e 4°C. Amostras de bainhas e folhas (5 g de massa fresca) foram maceradas em almofariz e pistilo com 15 mL do meio (tampão) de extração contendo sacarose 250 mmol L⁻¹, glicerol 100 mL L⁻¹, KCl 250 mmol L⁻¹, Tris-HCl 50 mmol L⁻¹ (pH 8,0), EGTA 2 mmol L⁻¹, 10 g L⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP), fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) 1 mmol L⁻¹, ditioneitol (DTT) 2 mmol L⁻¹ e 3 g L⁻¹ de albumina. O homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze em tubos de centrífuga. Todos os tubos foram calibrados com o tampão de forma a obter o mesmo peso. Em seguida, esses tubos foram submetidos a uma centrifugação de 5.000 rpm (4.500 g) por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido para outros tubos e novamente calibrado. Os resíduos foram descartados. Foram centrifugados a 9.000 rpm (14.600 g) por 10 minutos. Após a centrifugação, adicionou-se água tamponada (Tris-HCl 5 mM pH 8,0) até a metade do tubo centrífuga e em seguida, com a pipeta, colocou-se a amostra por baixo e completou por cima com mais água tamponada até 3 mm da parte superior do tubo. Novamente os tubos foram calibrados e centrifugados a 24.000 rpm (103.800 g) por 60 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado, que é a fração microsomal (vesículas de membrana plasmática e tonoplasto) foi ressuspenso com 2 mL de um meio contendo sorbitol 250 mmol L⁻¹, Tris-acetato 20 mmol L⁻¹ (pH 7,5), EGTA 1 mmol L⁻¹, MgCl₂ 2 mmol L⁻¹ e DTT 2 mmol L⁻¹. As amostras foram acondicionadas em tubos ependorff e congeladas a -25°C e posteriormente quantificadas as proteínas pelo método de BRADFORD (1976), onde a um tubo de ensaio foi acrescentado 0,1 mL do extrato protéico e 5 mL da solução de Coomassie Blue G-250. Após 10 minutos foi feita a leitura em 595 nm (A cor é estável por no máximo 1 hora). Os resultados foram confrontados com os de uma curva de calibração padrão de solução de albumina (100mg albumina/100ml NaCl 0,15N), nas seguintes de 0, 10, 20, 40, 80 e 100µg albumina.0,1 mL-1.

- **Atividade das P-H⁺-ATPases, V-H⁺-ATPases e H⁺-PPases**

A atividade das bombas de prótons, P-H⁺-ATPases, V-H⁺-ATPases e H⁺-PPases foram determinadas pela quantificação do fosfato inorgânico (Pi) liberado pela hidrólise de ATP (PM- e V-H⁺-ATPase) e PPI (H⁺-PPase). O meio de reação para a PM-H⁺-ATPase foi composto de MOPS-BTP 30 mmol L⁻¹ (pH 6,5), sorbitol 50 mmol L⁻¹, MgSO₄ 5 mmol

L⁻¹, KCl 50 mmoles L⁻¹, Na₂MoO₄ 1 mmol L⁻¹, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, KNO₃ 50 mmoles L⁻¹, NaN₃ 1 mmol L⁻¹ e ATP 5 mmoles L⁻¹. O meio de reação para as V-H⁺-ATPases foi composto de HEPES-BTP 30 mmoles L⁻¹ (pH 7,5), sorbitol 50 mmoles L⁻¹, MgSO₄ 5 mmoles L⁻¹, KCl 50 mmoles L⁻¹, Na₂MoO₄ 1 mmol L⁻¹, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, Na₃VO₄ 0,2 mmoles L⁻¹, NaN₃ 1 mmol L⁻¹ e ATP 5 mmoles L⁻¹. O meio de reação para as H⁺-PPase contém HEPES-BTP 30 mmoles L⁻¹ (pH 7,2), sorbitol 100 mmoles L⁻¹, MgSO₄ 5 mmoles L⁻¹, KCl 100 mmoles L⁻¹, 0,2 mL L⁻¹ de Triton X-100, NaN₃ 1 mmol L⁻¹ e PPi 1 mmol L⁻¹.

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

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

3.7.4 Atividade das Enzimas Glutamina Sintetase (GS)

A atividade da GS foi determinada segundo FARDEN & ROBERTSON (1980). Antes da determinação da atividade, fez-se a extração da enzima. Os 0,5 g do material foram macerados com N líquido no almofariz por 1 minuto. Em seguida, adicionou-se 4 ml de tampão de extração (Tampão imidazol-HCl 0,05 M pH 7,9 + ditiotreitól 5 mM + MgSO₄. 7H₂O 20 mM) e macerou-se por mais 45 segundos. Passou-se o material por uma gaze e recolheu-se o filtrado em tubo dentro do gelo. Retirou-se alíquota de 2 ml e transferiu-se para tubo de centrífuga (em gelo). Centrifugou-se por 15 minutos a 0°C e 11,5 rpm (15.000g). Após a centrifugação recolheu-se o sobrenadante e deste, determinou-se as atividades.

• Glutamina Sintetase

Em tubo de ensaio adicionou-se 0,5ml de coquetel de incubação (tampão imidazol-HCl 0,5 M pH 7,5 + β-mercaptanol 0,1mM + Mg SO₄ 0,4 M + hidroxilamina 0,1 M pH 6,5) + 0,1 ml glutamato 0,5 M pH 7,5 + 1,0 ml água destilada + 0,3 ml amostra. Deixou-se em banho-maria por 30 minutos a 30°C. Retirou-se e acrescentou 1,5 ml de solução de cloreto férrico. Centrifugou-se e procedeu-se a leitura em 540 nm. Os resultados foram confrontados com os de uma curva de calibração padrão de solução de γ-glutamil mono hidroxamato (0,0162g γ-glutamil/10ml água destilada), nas seguintes de 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 3,0 mM de γ-glutamil mono hidroxamato.

3.7.5 N-Total

O N-Total foi determinado pelo método de arraste a vapor descrito por TEDESCO et al. (1995). Amostras de duzentos mg de cada fração da parte aérea seca foram triturados e colocados em tubo de digestão, em capela de exaustão. Foram adicionados 1 ml de H₂O₂ 30%, 1,5 ml de H₂SO₄ concentrado e 0,7 g de mistura catalisadora (100g Na₂SO₄, 10g CuSO₄.5H₂O e 1g Selênio). Os tubos foram colocados em blocos digestores, e submetidos à temperaturas crescentes até total digestão. O material digerido foi destilado por arraste a vapor e titulado com H₂SO₄ 0,05 N padronizado com Tris, para determinação do teor de nitrogênio (em %) acumulado nas partes da planta. Para obtenção do nitrogênio total multiplicou-se esta porcentagem pela massa seca.

3.7.6. Análise dos grãos

As panículas de cada tratamento foram separadas em grãos cheios, grãos chochos e raqui (Figura 13).

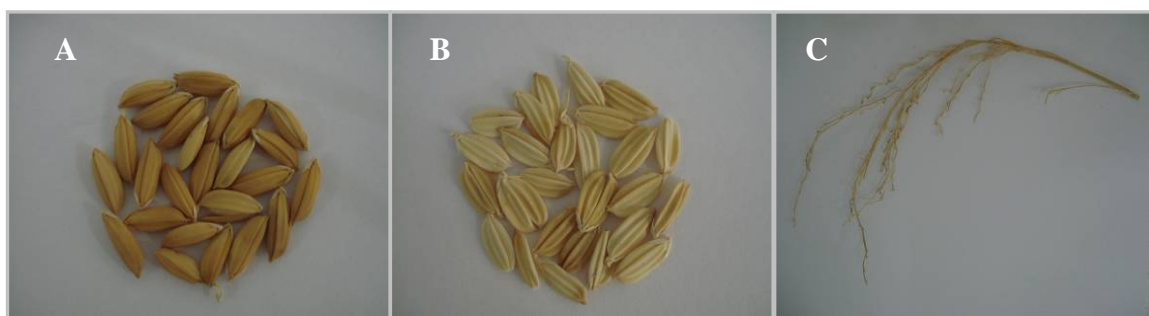


Figura 13. (A). Grãos cheios; (B). Grãos chochos; (C). Raqui.

Determinou-se o peso de 1000 grãos e número de grãos cheios e chochos por vaso. Amostras de 30 grãos cheios de cada tratamento foram descascados e mediu-se o comprimento, largura e espessura com o uso de um paquímetro digital de 150 mm da marca Digimess (Figura 14), para determinação dos seguintes caracteres de acordo com FONSECA et al., 1982 e 1984:

Classe do grão: Determinado pelo comprimento do grão após descasque.

1. Curto – comprimento < 5,00 mm
2. Médio – comprimento entre 5,00 a menos de 6,00 mm
3. Longo – comprimento \geq 6,00 mm
4. Longo-fino – comprimento \geq 6,00 mm; espessura \leq 1,90 mm e relação comprimento largura > 2,75 mm

Forma do grão: Classificada com base na relação comprimento e largura (C/L) dos grãos descascados, não polidos, considerando-se a escala.

1. Arredondado – C/L < 1,50
2. Semi-arredondada – C/L entre 1,50 e 2,00
3. Meio-alongado – C/L entre 2,00 e 2,75
4. Alongado – C/L entre 2,76 e 3,50
5. Muito alongado – C/L > 3,50



Figura 14. (A). Processo de descascamento dos grãos; (B). Paquímetro digital para medição do comprimento, largura e espessura (mm) dos grãos.

Os grãos descascados foram moídos e passados em almofariz até que todo o material ficasse com tamanho suficiente para passar por peneira de 60 mesh. A farinha obtida foi considerada integral e utilizada nas análises subseqüentes de N-Total, proteína bruta e fracionamento com quantificação de proteínas. Os grãos chochos, a raqui e a casca do grão cheio também foram triturados para análise de N-Total.

- **N-Total e teor de proteína bruta do grão**

Amostras de duzentos mg dos grãos descascados, dos grãos chochos, da casca e da raqui triturados foram digeridos com ácido sulfúrico, água oxigenada e mistura catalisadora. Após a destilação, conforme descrito acima, obteve-se o N-total (TEDESCO et al., 1995). O conteúdo de proteína bruta dos grãos descascados foi calculado pelo N-total multiplicado pelo fator 5,95. Este fator é baseado no conteúdo de nitrogênio (16,8%) da principal proteína do arroz, a glutelina (JULIANO, 1985).

- **Fracionamento das proteínas do grão**

A extração seqüencial de proteínas foi feita segundo SOUZA (1990), com modificações. Amostras de 120 mg de farinha foram colocadas em tubos de centrífuga de 2 ml.

Extração Salina: Um ml e meio de solução salina (2,9% NaCl + 0,002% Na-EDTA) foram adicionados às amostras. Durante um período de 30 minutos os tubos foram agitados à temperatura ambiente. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas a 12000 g / 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi separado e, em seguida, determinou-se o teor de albumina + globulina pelo método de BRADFORD, 1976, descrito anteriormente. Repetiu-se a operação de extração e determinação de proteína até que toda a proteína tivesse sido extraída. Sendo assim, foram necessárias mais 3 repetições (Figura 15).

Extração Alcoólica: Ao resíduo da extração salina, adicionou-se 1,5ml de solução alcoólica (50% Isopropanol, 41 mM Tris, 40 mM Ácido Bórico, 0,6% Mercaptanol). Durante um período de 30 minutos os tubos foram agitados e, em seguida, centrifugados a 1200 g / 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi separado e, em seguida, determinou-se o teor de prolamina pelo método de BRADFORD, 1976. Repetiu-se a operação de extração e determinação de proteína até que toda a proteína tivesse sido extraída. Sendo assim, foram necessárias mais 2 repetições (Figura 15).

Extração Alcalina: Ao resíduo da extração alcoólica, adicionou-se 1,5ml de solução alcalina (0,48% Ácido Bórico + 0,4% NaOH). Durante um período de 30 minutos os tubos foram agitados e, em seguida, centrifugados a 1200 g / 10 minutos a 10°C. O sobrenadante foi separado e, em seguida, determinou-se o teor de glutelina pelo método de BRADFORD, 1976. Repetiu-se a operação de extração e determinação de proteína até que toda a proteína tivesse sido extraída. Sendo assim, foram necessárias mais 6 repetições, porém com tempos de permanência à temperatura ambiente de 60 minutos cada (Figura 15).

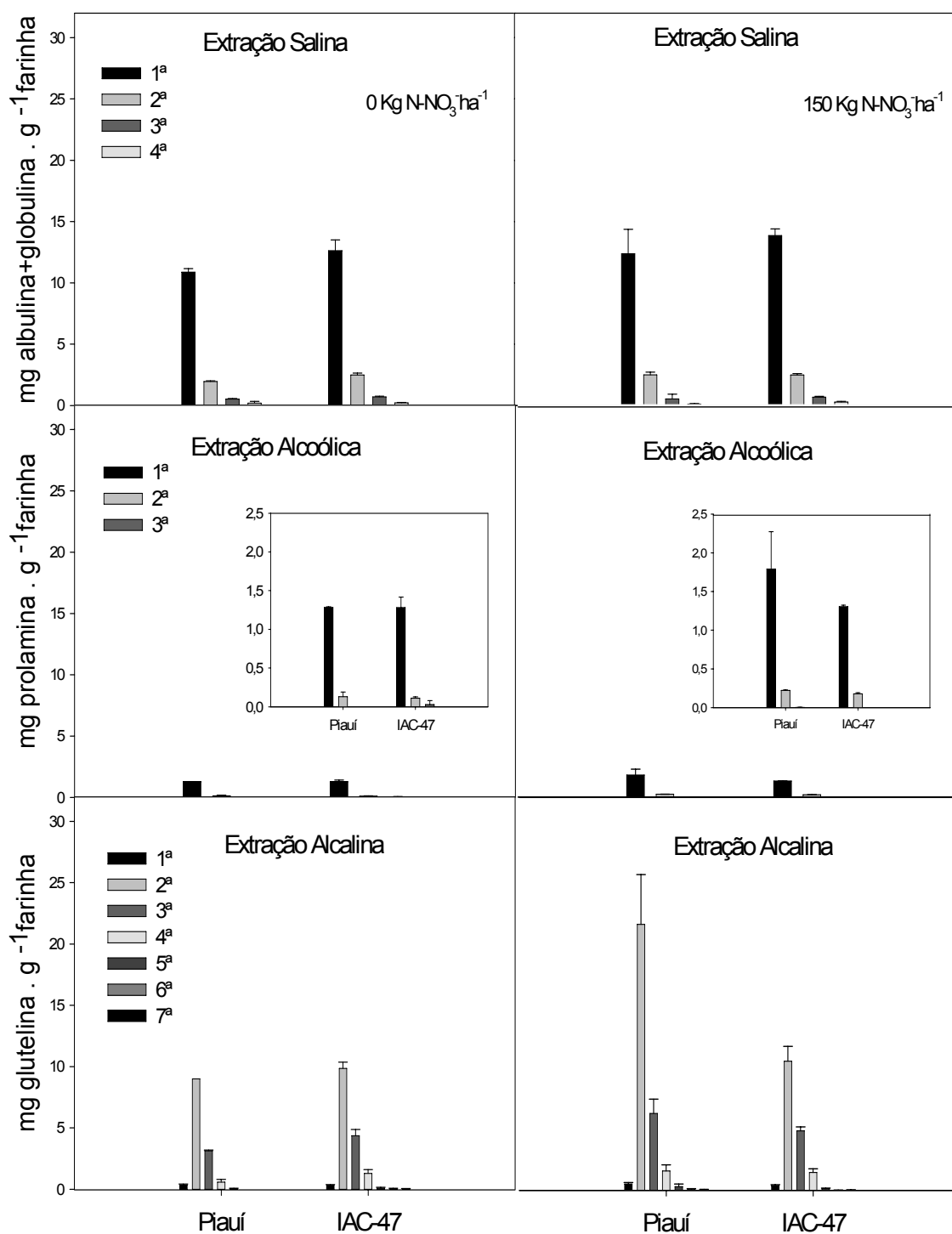


Figura 15. Teores de Albumina+globulina, de prolamina e de glutelina conforme as etapas de extrações salinas, alcoólicas e alcalinas, respectivamente, dos grãos de arroz de duas variedades sem e com adubação nítrica. 1^a, 2^a, 3^a, 4^a, 5^a, 6^a e 7^a—operações de extração.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Condições ambientais da casa de vegetação

A média das temperaturas máximas para o período experimental, de agosto a fevereiro, foi de $36,8 \pm 5,4^{\circ}\text{C}$, atingindo à máxima de 47°C , ocorrida nos meses de novembro a janeiro, e a média das temperaturas mínimas foi de $20,4 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$, chegando à mínima de 13°C , ocorrida no mês de setembro. A temperatura média geral do dia ocorrida durante o período experimental foi de $28,6 \pm 3,4^{\circ}\text{C}$ (Figura 16).

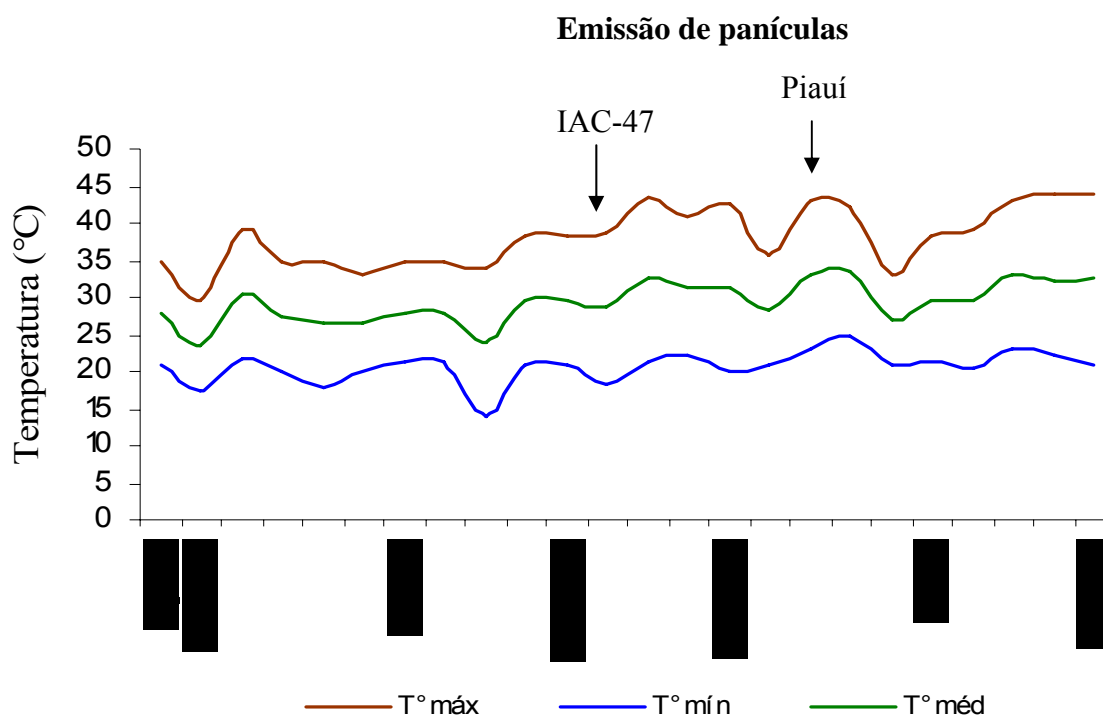


Figura 16. Temperaturas Máximas, Mínimas e Médias ($^{\circ}\text{C}$), nos meses de Agosto a Fevereiro, em casa de vegetação, durante o cultivo de arroz.

A média das umidades relativas e temperaturas para o período experimental, de agosto a fevereiro, às 9 horas foi de $66,7 \pm 18,2\%$ e $30,4 \pm 5,2^{\circ}\text{C}$, atingindo a máxima de 94% e 43°C e mínima de 39% e 20°C ; às 12 horas, a média foi de $62,8 \pm 18,5\%$ e $33,2 \pm 5,7^{\circ}\text{C}$, chegando à máxima de 94% e 44°C e mínima de 41% e 23°C ; e às 15 horas a média foi de $67,2 \pm 18,4\%$ e $30,4 \pm 5,5^{\circ}\text{C}$, com a máxima de 94% e 44°C e mínima de 42% e 21°C (Figura 17).

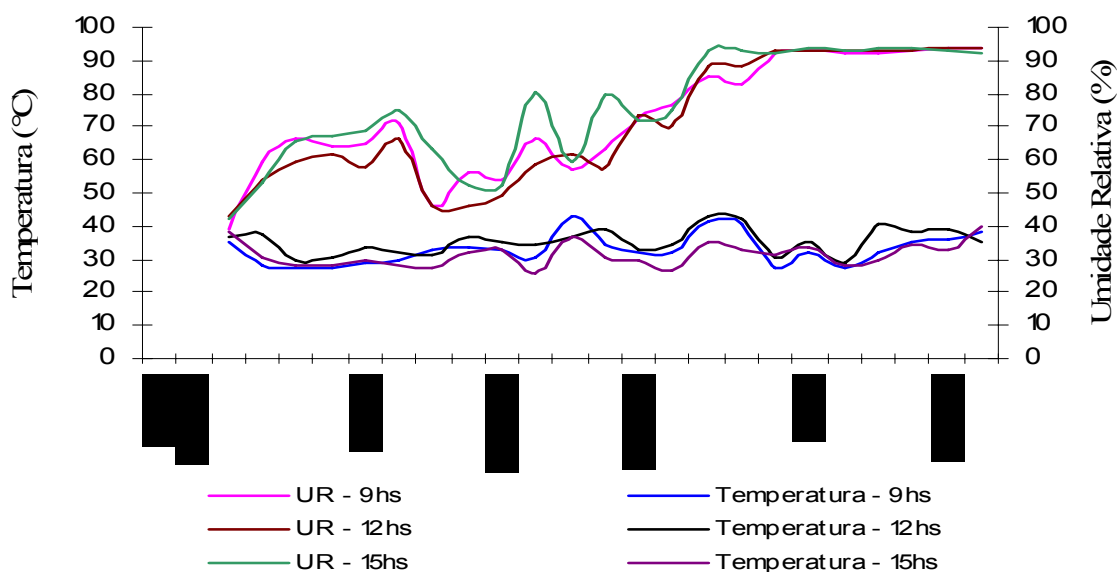


Figura 17. Temperaturas (°C) e Umidades Relativas (%) às 9, 12 e 15 horas, nos meses de Agosto a Fevereiro, em casa de vegetação, durante o cultivo de arroz.

A média da intensidade luminosa para o período experimental, de agosto a fevereiro, às 9 horas foi de $560,9 \pm 400,8$ ($\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), atingindo a máxima de 1800 e mínima de 47; às 12 horas, a média foi de $865,9 \pm 542,0$, chegando à máxima de 1800 e mínima de 100; e às 15 horas a média foi de $310,1 \pm 235,0$, com a máxima de 950 e mínima de 15 (Figura 18).

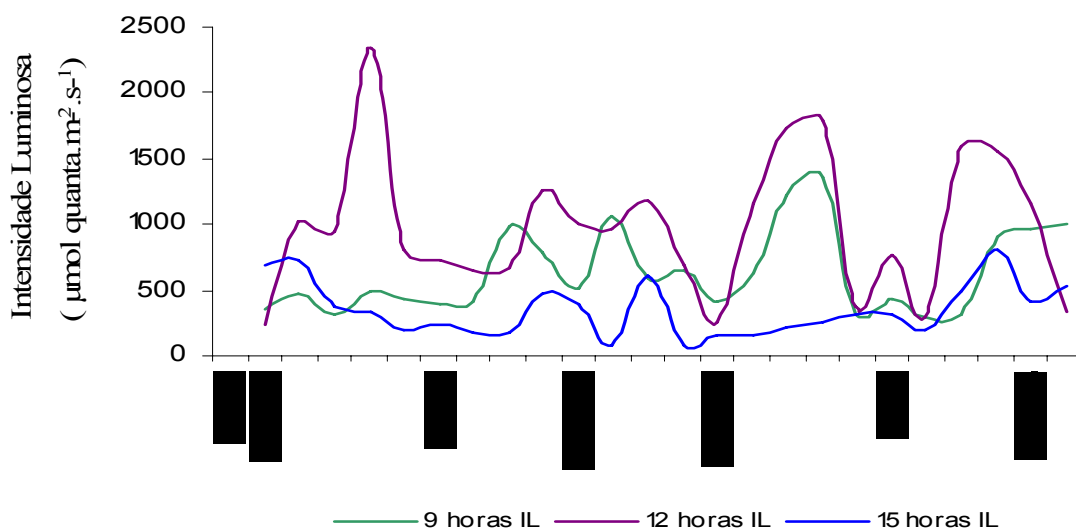


Figura 18. Intensidade Luminosa ($\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) às 9, 12 e 15 horas, nos meses de Agosto a Fevereiro, em casa de vegetação, durante o cultivo de arroz.

A temperatura é um fator ambiental que isoladamente tem maior importância no desenvolvimento vegetal, portanto, uma análise mais detalhada da temperatura, ocorrida nas principais fases do ciclo e nas épocas de coleta, é dada na Tabela 2. Nesta tabela também estão os dados de intensidade luminosa e umidade relativa ocorridas nestes períodos.

No momento do transplante do arroz, o interior da casa de vegetação se encontrava com temperatura variando em torno de 35°C, intensidade luminosa (IL) próxima a de saturação pelas plantas C₃, pela manhã com 680 ($\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) apresentando radiação mais elevada ao meio-dia, decrescendo à tarde, e com umidade relativa (UR) baixa em torno de 44% (Tabela 2). Esse comportamento ambiental manteve-se até a primeira coleta das plantas de arroz. A partir desta coleta, as variedades foram colhidas em épocas distintas por apresentarem ciclo diferenciado, portanto, sendo submetidas às condições microclimáticas diferentes em fases distintas. A variedade IAC-47 completou seu ciclo em 110 dias, enquanto que a Piauí, em 150 dias. Essa variação de ciclo pode ser resultado do fotoperíodo diferenciado a que as variedades foram submetidas.

A variedade IAC-47 completou seu ciclo antes da Piauí entrar na fase reprodutiva. A emissão das panículas da variedade IAC-47 ocorreu em período com temperaturas diurnas máximas em torno de 37°C e noturnas, de 20°C, com ocorrência de IL mais elevada às 12 horas e UR baixa ao longo dos dias (Tabela 2). A segunda e terceira coleta da IAC-47 foi realizada em época com UR mais elevadas variando de 58 a 84%, IL mais baixas e com temperaturas se elevando da segunda para a terceira coleta (período se aproximando do verão). Já na fase de emissão das panículas da variedade Piauí, as temperaturas medidas nesta fase foram superiores as da época da IAC-47, com máximas de 45°C e noturnas de 24°C, havendo maior variação entre as temperaturas, com IL elevadas pela manhã decrescendo bruscamente à tarde e UR alta em torno de 93% (Tabela 2). Neste período da Piauí, ocorriam altas temperaturas e IL pela manhã até o meio-dia, com nebulosidades pela tarde; muitas vezes, com pancadas de chuva, pois era época de início de verão. Na segunda e terceira coleta a umidade relativa manteve-se elevada, com IL mais baixas após o florescimento e temperaturas elevadas decrescendo à tarde.

Tabela 2. Temperaturas máximas e mínimas diárias e temperatura, intensidade luminosa e umidade relativa medidas às 9, 12 e 15 horas, durante a condução do experimento no interior da casa de vegetação.

Procedimentos e Coletas	Temperatura					Intensidade Luminosa			Umidade Relativa		
	-----°C-----					-- $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ --			-----%-----		
	Máxima	Mínima	9 hs	12 hs	15hs	9 hs	12 hs	15 hs	9 hs	12 hs	15 hs
Transplântio	35	21	34	35	35	680	1200	490	42	44	45
Adubação	39	21	35	38	38	545	1300	470	41	43	45
Ocorrência de percevejo	35	21	31	32	32	600	1250	455	54	49	55
Desbaste	39	18	31	35	37	850	1350	700	47	41	43
1ª Coleta (1C)	41	21	37	40	27	950	1350	125	43	46	77
Primeiras panículas IAC (1PI)	37	20	35	37	32	950	1650	700	41	41	44
Primeiras panículas Piauí (1PP)	45	24	43	41	35	1800	1700	75	83	94	93
2ª Coleta IAC (2CI)	36	19	30	26	25	1500	85	135	58	70	84
2ª Coleta Piauí (2CP)	41	21	33	32	29	465	350	180	93	93	93
3ª Coleta IAC (3CI)	44	23	34	44	36	650	680	18	63	58	69
3ª Coleta Piauí (3CP)	43	20	30	39	28	800	1000	400	93	93	93
Coleta final dos grãos (CF IAC-47)	43	22	35	39	35	750	1050	360	63	58	69
Coleta final dos grãos (CF Piauí)	45	21	39	42	38	1450	1600	560	94	94	93

4.2 Característica morfológica da parte aérea das plantas

4.2.1 Massa Fresca

As duas variedades apresentaram maior massa fresca em todas as partes quando suplementadas com $150 \text{ kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$ (Figura 19 e Figura 20), devido a maior produção de perfilhos como observado nas Figura 19, Figura 21 e Figura 23.

Na fase inicial de desenvolvimento, aos 35 DAT, a variedade IAC-47, em ambas as doses de nitrogênio, apresentou maior massa fresca (MF) de folhas inferiores (FI) e bainha+colmo (B+C) em relação à variedade Piauí (Figura 20), indicando um maior desenvolvimento inicial, como pode ser visto na Figura 19. Resultados semelhantes foram obtidos em arroz, por SANTOS (2006b) para as mesmas variedades, e em milho, por BORGES et al., 2006, a qual verificou, aos 32 DAG, menor peso de matéria fresca das folhas na variedade Sol da Manhã em relação à BRS 1010 sob a menor dose de N.



Figura 19. Plantas das variedades Piauí (1 e 2) e IAC-47 (3 e 4) aos 35 dias após o transplante (DAT), com e sem adubação suplementar de $150 \text{ Kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$. (1. Piauí sem adubação; 2. Piauí com $150 \text{ Kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$; 3. IAC-47 sem adubação e 4. IAC-47 com $150 \text{ Kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$).

Ao entrar na fase reprodutiva, aos 15 DAA, na ausência de adubação nitrogenada, as duas variedades aumentaram massa fresca da Bainha+Colmo pelo alongamento na fase de emborrachamento e reduziram das folhas inferiores, pela presença de folhas senescentes, no entanto havendo superioridade na variedade Piauí (Figura 21). Quanto à folha bandeira (FB) e folha 2 (F2) não houve diferença entre as variedades. Aos 30 DAA, a variedade Piauí reduziu massa fresca das F2 e Bainha+Colmo e manteve da FB e FI, enquanto que a variedade IAC-47 continuou a aumentar na Bainha+Colmo, manter nas folhas inferiores e Folha 2 e diminuir na folha bandeira (Figura 20). Quando as plantas foram adubadas, a variedade IAC-47 manteve a massa fresca superior a Piauí em todas as partes da planta, aos 15 DAA. Já aos 30 DAA, a Piauí manteve a massa fresca enquanto que a IAC-47 reduziu a das FI e B+C, se igualando a Piauí.

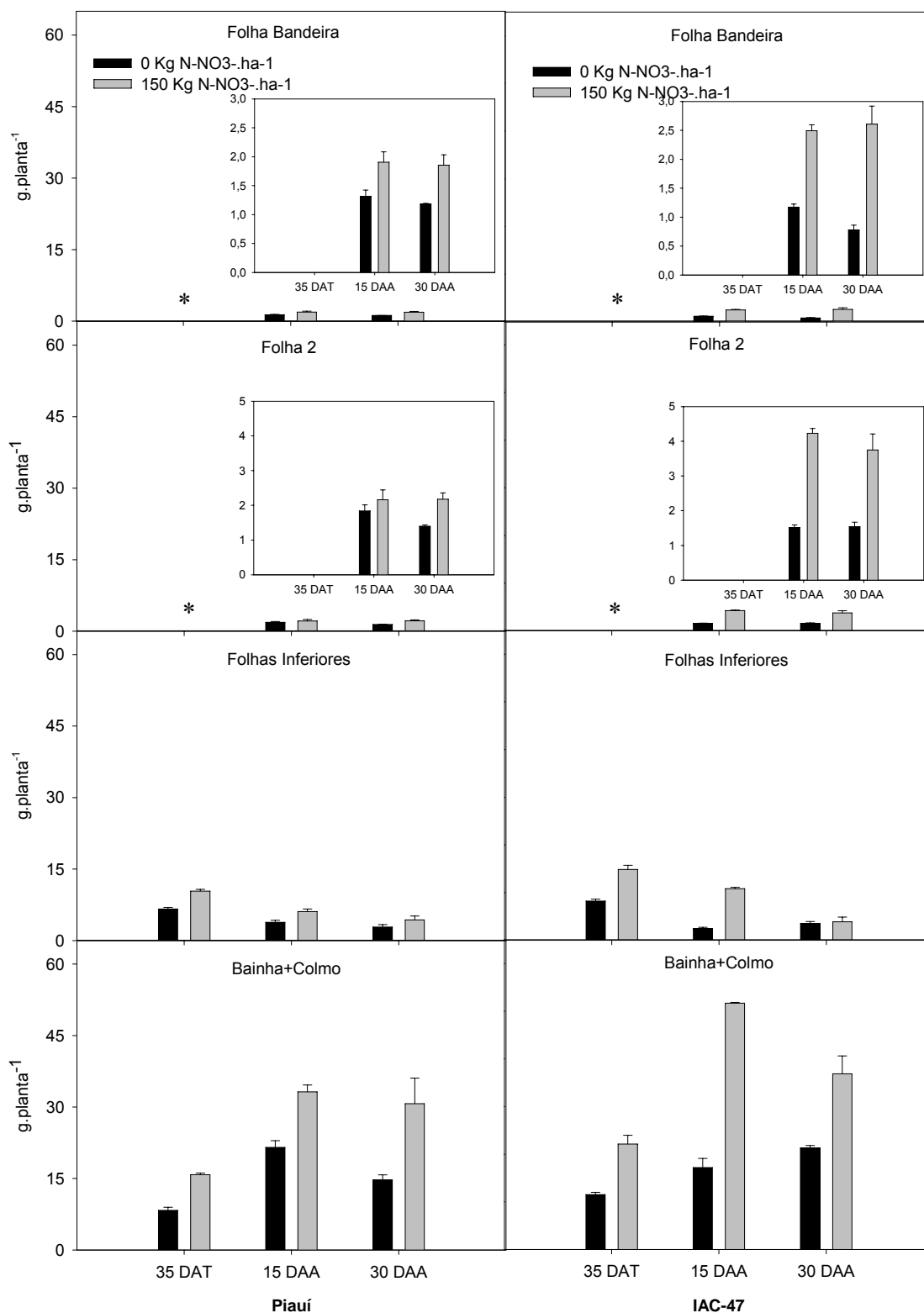


Figura 20. Massa Fresca (g planta⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

Os resultados sugerem que sob baixa disponibilidade de N, a variedade tradicional Piauí produziu menos órgãos vegetativos do que a variedade melhorada na fase inicial de desenvolvimento, provavelmente acumulando mais NO_3^- do que utilizando para crescimento, para poder investir mais na fase reprodutiva, garantindo a formação e enchimento dos grãos. Já sob maior disponibilidade de nitrogênio, a IAC-47, por ser uma planta desenvolvida para responder à adubação, superou a Piauí em todas as fases e em todas as partes das plantas investindo sempre em órgãos vegetativos.



Figura 21. Plantas das variedades Piauí (1 e 2) e IAC-47 (3 e 4) aos 35 dias após o transplântio (DAT), com e sem adubação suplementar de $150 \text{ Kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$. (1. Piauí sem adubação; 2. Piauí com $150 \text{ Kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$; 3. IAC-47 sem adubação e 4. IAC-47 com $150 \text{ Kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$).

Analisando a massa fresca total das plantas, pode ser observado no tratamento sem nitrato, que a variedade Piauí, na fase vegetativa, apresentou menor crescimento inicial em relação a IAC-47 (Figura 22). Isto indica uma estratégia adotada pela variedade tradicional, que em detrimento ao crescimento vegetativo, acumula uma maior quantidade de nitrogênio. Ao entrar na fase reprodutiva, aos 15 DAA, a variedade Piauí superou a IAC-47 (Figura 22), provavelmente, pelo maior alongamento do colmo, além da produção de órgãos vegetativos para aumentar a produção de fotoassimilados que serão direcionados para os grãos. Aos 30 DAA, a variedade tradicional reduziu sua massa fresca por se encontrar em fase final de ciclo com grande número de folhas senescentes, diferentemente da variedade melhorada que apesar de se encontrar em final de ciclo apresentou mais folhas verdes. Este resultado indica maior eficiência de remobilização atribuída à variedade tradicional, por, aparentemente, ter remobilizado mais rapidamente quase todo o N para os grãos, entrando mais rápido em senescência, diferentemente da variedade melhorada, que apresentou um processo de remobilização menos eficiente, com provável competição entre a manutenção das folhas verdes e o crescimento reprodutivo.

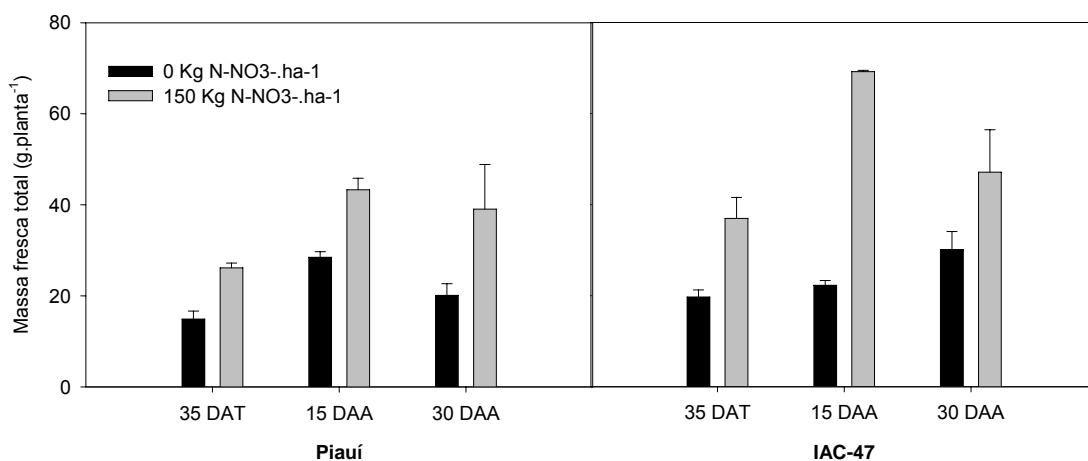


Figura 22. Massa Fresca total (g planta⁻¹) de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese.

Quando sob maior disponibilidade de nitrato, ambas as variedades aumentaram a MF em todas as fases, no entanto a variedade IAC-47 apresentou maior resposta à adubação mantendo massa fresca total superior a Piauí até os 15 DAA, reduzindo aos 30 DAA (Figura 22). A variedade melhorada obteve um aumento relativo de 87% aos 35 DAT, 211% aos 15 DAA, e 56% aos 30 DAA, enquanto que a Piauí aumentou em 76, 52 e 94%, aos 35 DAT, 15 e 30 DAA, respectivamente.

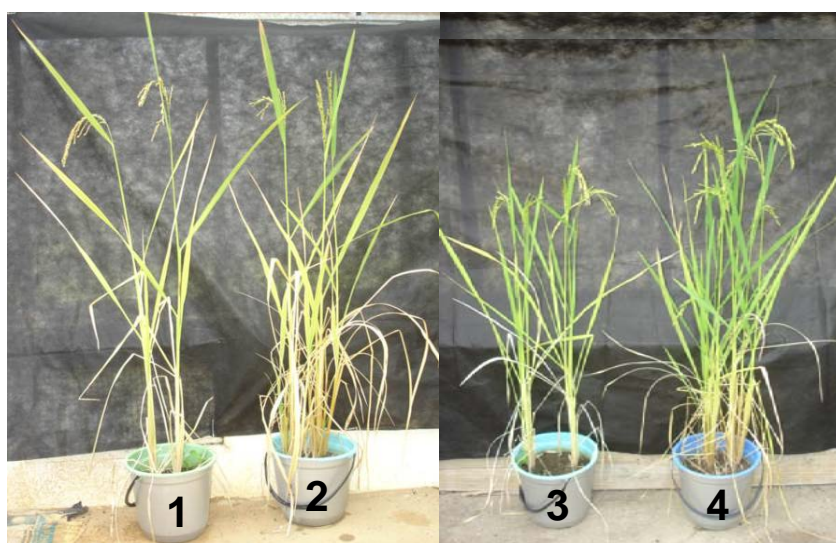


Figura 23. Plantas das variedades Piauí (1 e 2) e IAC-47 (3 e 4) aos 35 dias após o transplântio (DAT), com e sem adubação suplementar de 150 Kg N-NO₃⁻. ha⁻¹. (1. Piauí sem adubação; 2. Piauí com 150 Kg N.ha⁻¹; 3. IAC-47 sem adubação e 4. IAC-47 com 150 Kg N.ha⁻¹).

Estes resultados estão de acordo com os obtidos em milho por MAJEROWICZ et al. (2002), estudando a eficiência no uso de nitrogênio (EUN) em var. tradicional e melhorada, onde observaram maior variação no acúmulo de MS na parte aérea nas variedades melhoradas e menor variação nas tradicionais em função da dose de N.

Esses resultados indicam uma maior adaptação da Piauí á locais com baixa disponibilidade de nitrogênio e um melhoramento da IAC-47 para responder à ambientes com solos de maior fertilidade.

4.3 Características quantitativas da parte aérea das plantas

4.3.1 Frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Avaliando as frações nitrogenadas e açúcares solúveis nos quatro segmentos da parte aérea das plantas durante a fase vegetativa, observa-se um aumento nos teores de N-NO_3^- em plantas de arroz com o aumento da disponibilidade de N no solo (Figura 24). Nesta fase, aos 35 DAT, na ausência de adubação nítrica, a variedade Piauí apresentou maiores teores de N-NO_3^- nas folhas inferiores e bainha+colmo em relação a IAC-47, mostrando que mesmo sem adubação, a variedade tradicional acumulou mais nitrato. Este resultado reforça a indicação de que as variedades tradicionais apresentam maior adaptação a condições de baixa disponibilidade de nitrogênio, acumulando mais NO_3^- na fase inicial de desenvolvimento para poder mais tarde utilizá-lo para formação e enchimento dos grãos. Resultados semelhantes foram obtidos para essas duas variedades por RODRIGUES et al., 2004, SANTOS et al. (2007) e BUCHER (2007).

Com o suprimento elevado de nitrogênio, a Piauí apresentou um incremento de NO_3^- de 284 % nas folhas e 1.089 % na bainha+colmo, enquanto que a IAC-47 apresentou um aumento relativo nas folhas de 469 % e bainha+colmo de 26.436 %. Este maior aumento relativo obtido pela variedade IAC-47 ao adubar é justificado por ser uma variedade melhorada para responder à adubação nitrogenada para aumentar o potencial de produção. Mesmo assim, a variedade Piauí manteve níveis de NO_3^- superiores nas folhas. Após a antese, os teores de NO_3^- reduziram bruscamente na bainha+colmo e nas folhas inferiores em ambas as variedades (Figura 24). Isso porque no momento do enchimento dos grãos, há uma tendência do NO_3^- que está sendo absorvido ou remobilizado, ser direcionado para as folhas mais novas como a folha 2 e para a folha bandeira responsável pela produção de fotoassimilados para os grãos. A variedade tradicional, aos 15 DAA, apresentou maiores teores de N-NO_3^- na folha 2 e folha bandeira em ambas as doses quando comparada a IAC-47 (Figura 24), mostrando, aparentemente, a maior eficiência desta variedade em utilizar o nitrato acumulado, na fase reprodutiva para produzir proteínas que serão direcionadas para os grãos. Neste período não foi detectado teor de nitrato na variedade IAC-47 na ausência de adubação nítrica. Aos 30 DAA, a variedade IAC-47 apresentou maiores níveis de N-NO_3^- na folha 2 e folha bandeira, como resultado de uma provável aquisição deste íon da terra nesta fase ou remobilização do nitrato das raízes, uma vez que aos 15 DAA se encontrava praticamente nulo (Figura 24). Esse resultado reforça a idéia da maior eficiência da variedade Piauí em aproveitar todo o NO_3^- absorvido.

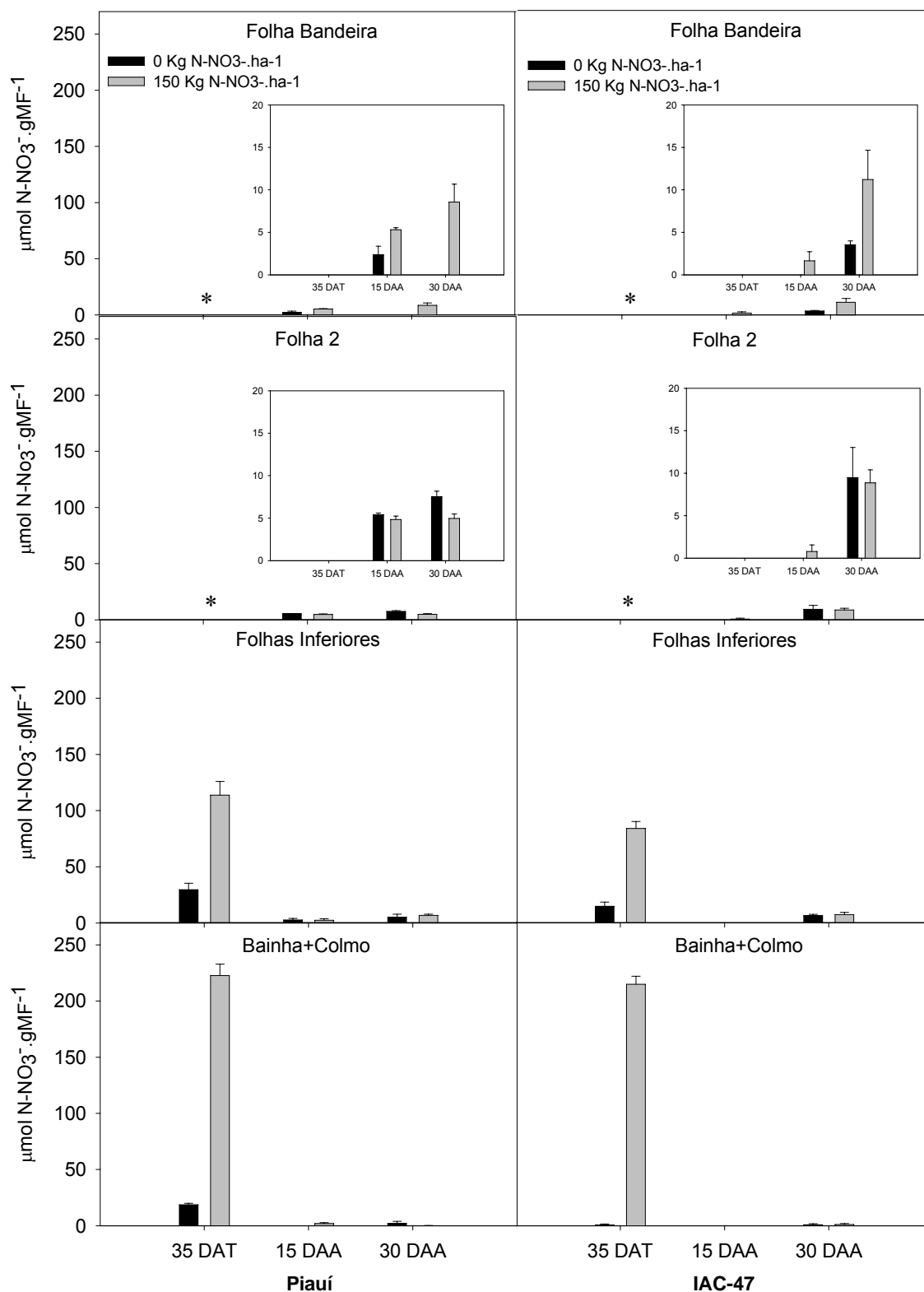


Figura 24. Teores de N-NO₃⁻ (µmol.g massa fresca⁻¹) na folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplântio; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

Avaliando-se o conteúdo de nitrato em diferentes partes das plantas, é possível observar que na ausência de adubação nítrica, a variedade Piauí, apesar de ter apresentado uma menor massa fresca de folhas inferiores e bainha+colmo (Figura 19) em relação a variedade IAC-47, apresentou maior conteúdo de NO_3^- nestes tecidos (Tabela 3). Esse comportamento, reforça a hipótese de que as variedades tradicionais apresentam maior capacidade de acúmulo de NO_3^- na fase inicial de crescimento, principalmente na bainha+colmo, em detrimento ao crescimento vegetativo, em condições de menor disponibilidade de nitrogênio. Quando as plantas foram adubadas, ambas as variedades elevaram seu conteúdo de NO_3^- nos tecidos vegetativos, porém a variedade IAC-47, por ser uma variedade melhorada para responder à adubação, apresentou maior conteúdo (Tabela 3) associado a maior massa fresca na bainha+colmo.

Aos 15 DAA, a variedade Piauí apresentou maior conteúdo de NO_3^- em todos os segmentos da parte aérea, nos tratamentos com e sem adubação de nitrato em relação a IAC-47, com maior remobilização das folhas inferiores e bainha+colmo para as folhas mais jovens, folha bandeira e folha 2 (Tabela 3). Desta época até os 30 DAA, ocorreu na variedade Piauí, uma diminuição do conteúdo de nitrato da bainha+colmo, indicando um processo de remobilização mais eficiente e conseqüente consumo de NO_3^- para formação e enchimento dos grãos. O que difere da variedade IAC-47, que apresentou aumento no conteúdo de nitrato em todos os tecidos da parte aérea, se mostrando, portanto, menos eficiente no uso de NO_3^- .

Tabela 3. Conteúdo de NO_3^- ($\mu\text{mol}\cdot\text{parte da planta}^{-1}$) na folha bandeira (FB), folha 2 (F2), folhas inferiores (FI) e bainha+colmo (B+C), aos 35 dias após transplântio (DAT), aos 15 e 30 dias após antese (DAA) de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47), com ou sem 150 Kg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$.

Tratamento	Época de Coleta	FB	F2	FI	B+C	Total
		-----($\mu\text{mol N-NO}_3^- \cdot \text{parte da planta}^{-1}$)-----				
Piauí 0 Kg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$	35 DAT			155,41 Ba	194,54 Ba*	349,95 Ba
	15 DAA	3,05 Ba	9,93 Aa	10,18 Ba	30,51 Ba	53,68 Ba
	30 DAA	ND**	10,47 Ab	14,64 Bb	15,36 Ab	40,47 Bb
IAC-47 0 Kg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$	35 DAT			121,06 Bb	9,33 Bb	130,39 Bb
	15 DAA	ND	ND	ND	ND	ND
	30 DAA	13,36 Ba	14,59 Ba	22,26 Ba	19,97 Ba	70,18 Ba
Piauí 150 Kg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$	35 DAT			1176,81 Aa	3513,71 Ab	4690,52 Ab
	15 DAA	10,11 Aa	10,45 Aa	14,11 Aa	63,08 Aa	97,75 Aa
	30 DAA	15,88 Ab	10,81 Ab	29,18 Aa	4,80 Bb	60,67 Ab
IAC-47 150 Kg $\text{N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$	35 DAT			1246,13 Aa	4758,45 Aa	6004,58 Aa
	15 DAA	4,11 Ab	3,32 Ab	ND	ND	7,43 Ab
	30 DAA	29,25 Aa	33,28 Aa	28,64 Aa	40,37 Aa	131,54 Aa

* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula entre as doses de N-NO_3^- e minúscula entre as variedades, não diferem entre si pelo teste F a nível de 5% de significância

** ND: não detectado

Teores semelhantes de N-NH_4^+ foram encontrados nas variedades em quase todas as partes das plantas, de todas as coletas, nas duas doses de N, diferindo apenas na folha bandeira (Figura 25). Maiores teores de amônio foram encontrados na fase vegetativa, principalmente nos tratamentos submetidos à adubação níttrica, por ser uma fase de intenso crescimento. Entrando na fase reprodutiva, aos 15 DAA, os níveis de N-NH_4^+ decresceram se mantendo constante até os 30 DAA em todos os tratamentos, com exceção da folha bandeira. Na ausência de adubação, a variedade Piauí, aos 15 DAA, apresentou maiores teores de amônio na folha bandeira em relação a IAC-47. Esse resultado reforça a indicação de maior capacidade, da variedade tradicional, de remobilização e redução do N-NO_3^- na fase de enchimento dos grãos, se mostrando, aparentemente, mais eficiente no uso do nitrogênio acumulado. Aos 30 DAA, os níveis se inverteram entre as variedades. Esse aumento nos níveis de amônio ao final do ciclo, pode ser resultado de senescência e catabolismo. Quando sob elevado suprimento de nitrogênio, aos 15 DAA, a IAC-47 apresentou maiores níveis de NH_4^+ e aos 30 DAA, não houve diferença entre as variedades (Figura 25).

Maiores teores de N-amino foram encontrados nas folhas inferiores em relação à Bainha+Colmo, aos 35 DAT (Figura 26), isso porque as folhas são os principais órgãos de assimilação de nitrogênio. Na fase inicial de desenvolvimento, na ausência de adubação níttrica, a variedade Piauí apresentou maiores teores de N-amino. Ao entrar na fase reprodutiva, reduziram-se os teores de aminoácidos nos tecidos, permanecendo sem diferença entre as variedades até os 30 DAA. Quando as plantas foram supridas com nitrato, aos 35 DAT, os teores de N-amino se elevaram bastante nas folhas inferiores, não havendo diferença entre as variedades enquanto que na Bainha+Colmo houve pouco acréscimo nos níveis apenas na IAC-47. Após a antese, aos 15 DAA, ocorreu um decréscimo nos níveis de aminoácidos em ambas as variedades, porém com superioridade na variedade IAC-47 em todos os órgãos vegetativos, chegando aos 30 DAA sem diferença entre as variedades.

Os teores de açúcares solúveis nos tecidos são indicadores de energia prontamente disponível para o metabolismo celular (SOUZA, 1995). Sendo assim, maiores teores são encontrados na fase inicial de desenvolvimento, principalmente nas folhas, pela grande demanda energética para o crescimento vegetativo (Figura 27). Na fase vegetativa, quando na ausência de adubação níttrica, não houve diferença entre as variedades nas folhas inferiores, entretanto com maiores níveis na Bainha+Colmo da variedade IAC-47. Após a antese, não houve diferença entre as variedades. Quando submetidas á níveis mais elevados de nitrato, a variedade Piauí manteve os teores de açúcares solúveis similares em todas as partes das plantas e em todas as épocas de coleta, diferentemente da IAC-47 que, com a adubação, aumentou os teores de açúcares solúveis, superando a Piauí em todas as épocas.

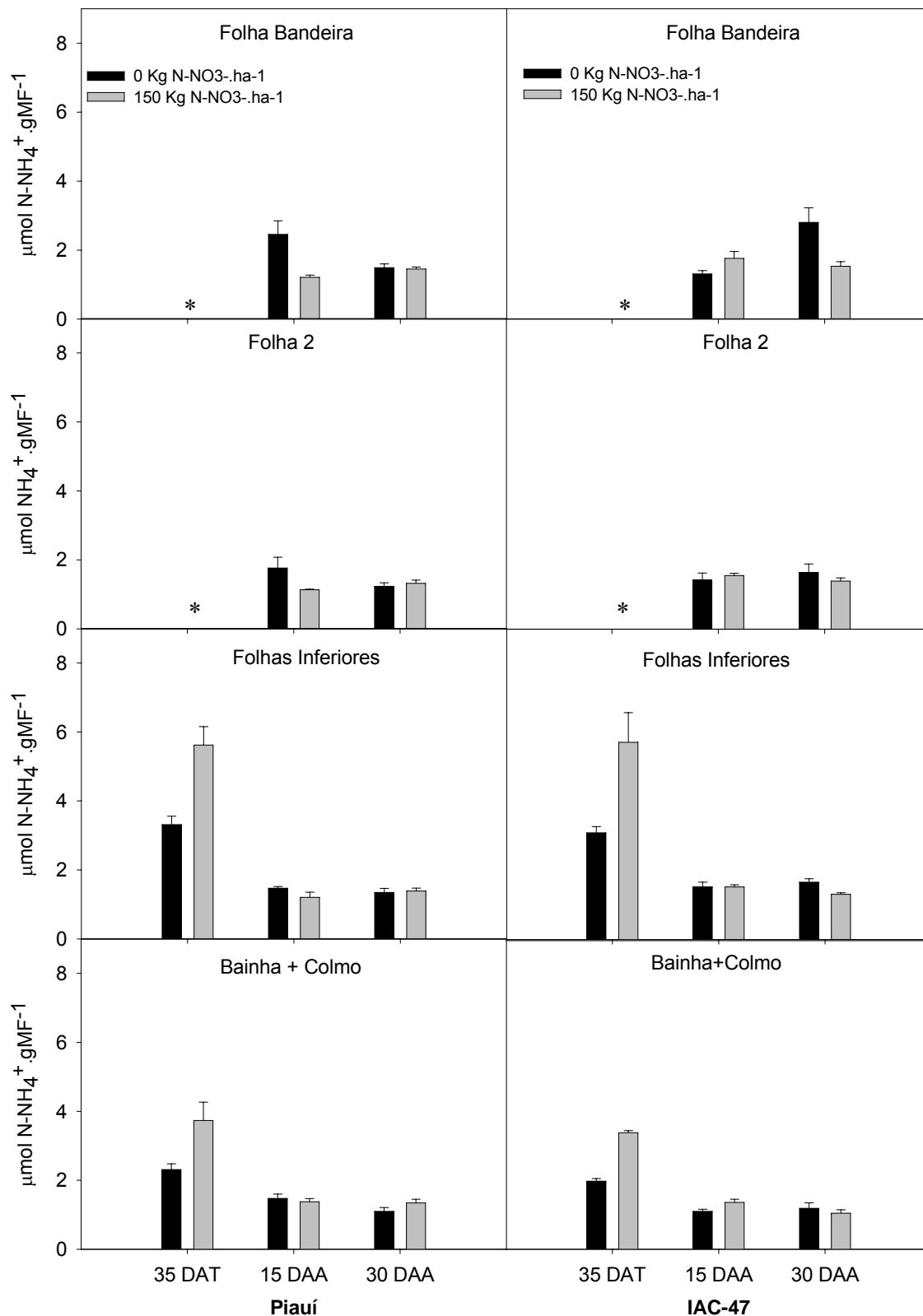


Figura 25. Teores de N-NH₄⁺ (μmol.g massa fresca⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

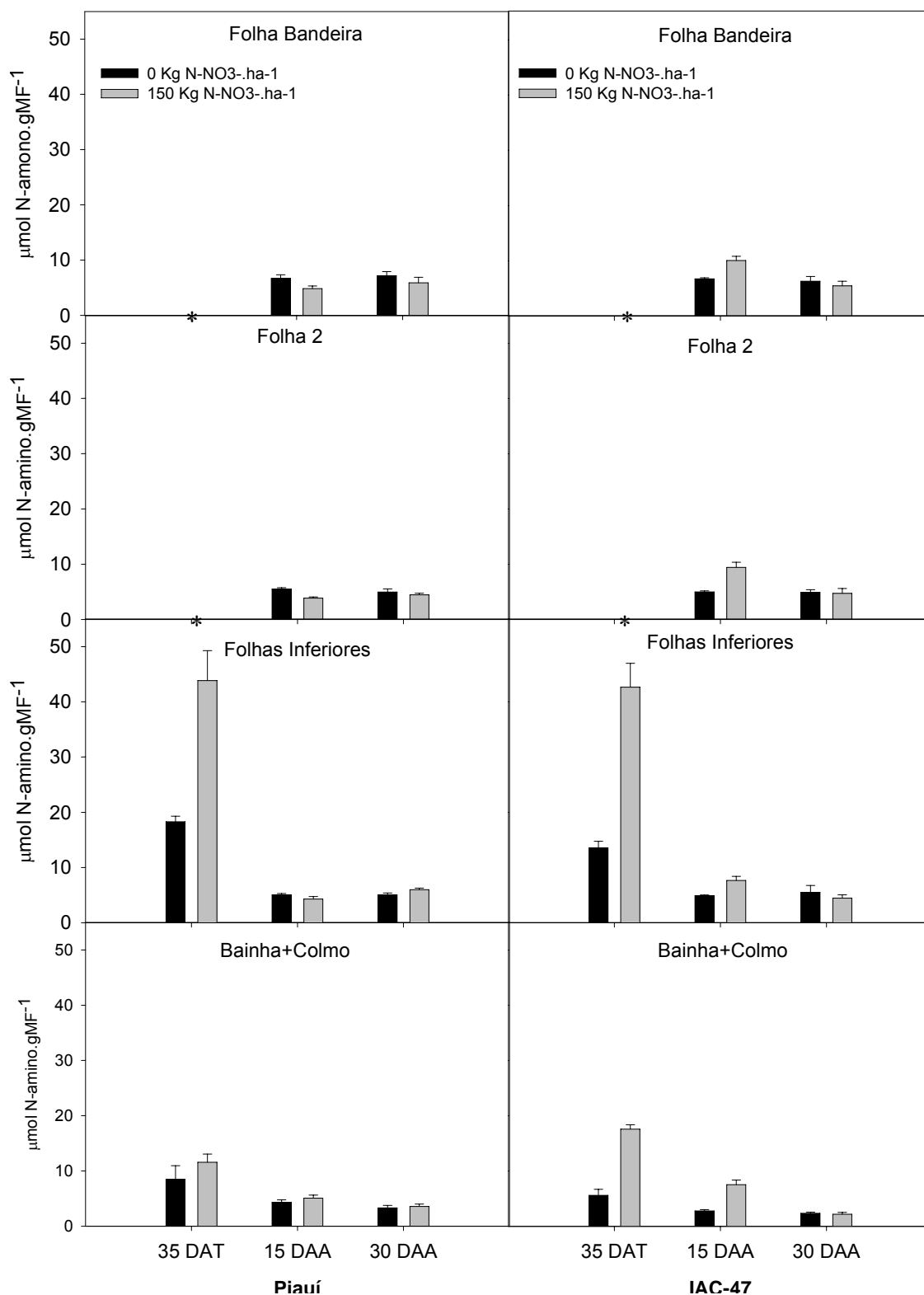


Figura 26. Teores de N-amino ($\mu\text{mol.g massa fresca}^{-1}$) na folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

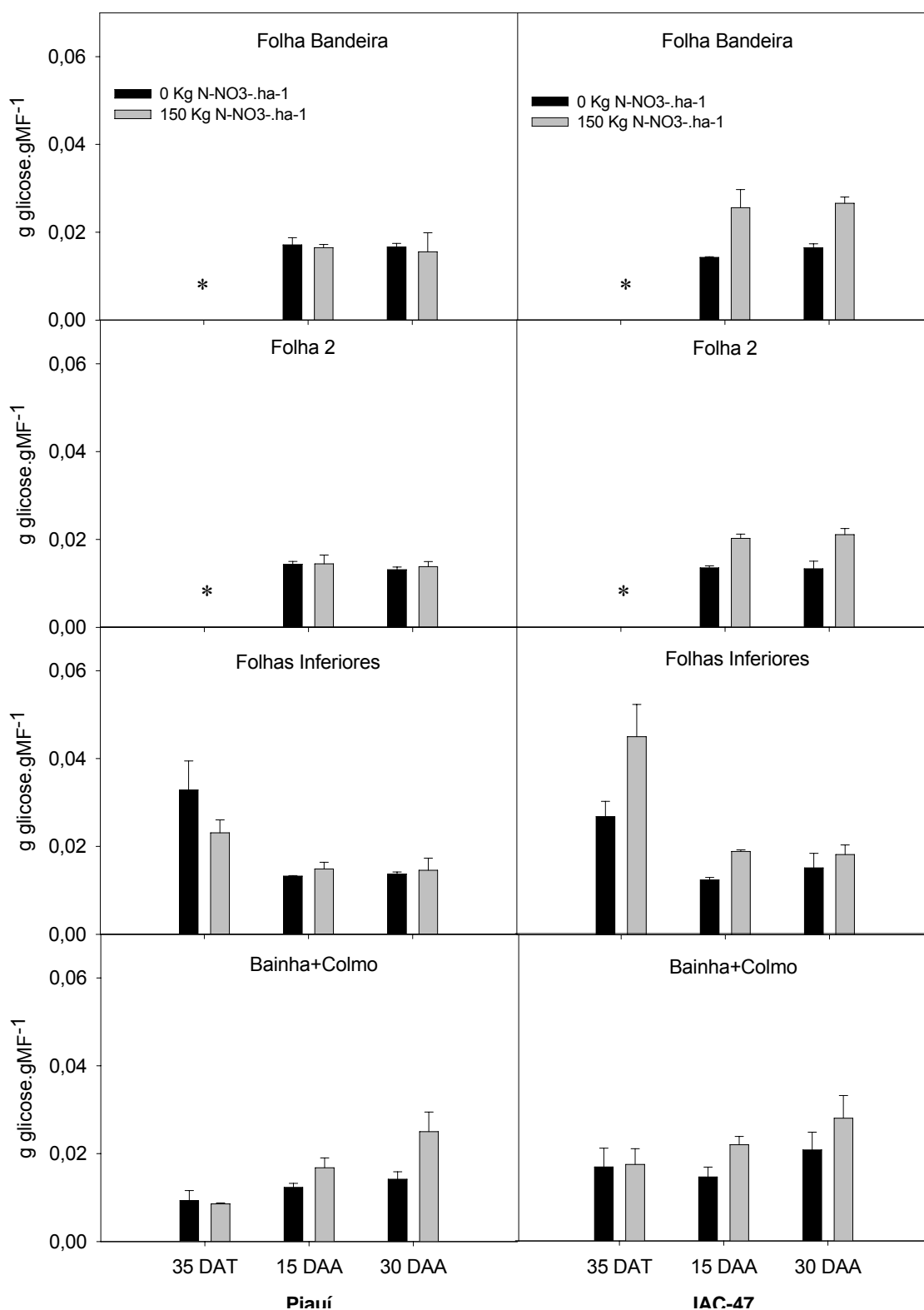


Figura 27. Teores de açúcares solúveis ($\text{g.g massa fresca}^{-1}$) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com $150 \text{ Kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

Os resultados de frações nitrogenadas e açúcares solúveis podem ser melhor explorados quando se analisa o conteúdo total na parte aérea inteira, apresentados na Tabela 4, por levar em consideração a massa fresca.

Nesta tabela, observa-se, na fase inicial de crescimento, sob a menor dose de N, que apesar da variedade Piauí apresentar uma menor massa fresca, o seu conteúdo de nitrato manteve-se superior em comparação à variedade IAC-47. Isso indica que a variedade tradicional apresenta uma estratégia de acumular nitrato, em detrimento ao crescimento vegetativo. Com o suprimento mais elevado de nitrato, as duas variedades apresentaram um aumento no conteúdo de NO_3^- nos tecidos, no entanto, maior incremento foi observado na variedade IAC-47, apresentando maior conteúdo deste íon em relação a Piauí, por se tratar de uma variedade melhorada para responder à adubação, investindo no crescimento vegetativo, em detrimento ao acúmulo de NO_3^- (Tabela 4). O mesmo resultado não pôde ser observado quando analisado apenas o teor de NO_3^- ($\mu\text{mol.g}$ massa fresca⁻¹) (Figura 24). Na fase reprodutiva, sob as duas doses de N, a variedade Piauí apresentou conteúdo de nitrato superior a IAC-47, aos 15 DAA, ocorrendo o inverso aos 30 DAA, sugerindo que a variedade tradicional apresenta um processo de remobilização mais eficiente do que a variedade melhorada, por, aparentemente, ter remobilizado o NO_3^- acumulado e assimilando-o mais rapidamente, aos 15 DAA, apresentando mais folhas senescentes (Figura 21), diferentemente da IAC-47 que manteve as folhas mais verde nesta época, até os 30 DAA (Figura 23), se mostrando menos eficiente no processo de remobilização. Nestas circunstâncias, aparentemente, a variedade tradicional apresenta maior capacidade em acumular nitrato na fase inicial de desenvolvimento, remobilizando-o na fase reprodutiva para formação e enchimento dos grãos.

Quando se analisa o conteúdo de N-NH_4^+ total na planta (Tabela 4), observa-se, sob a ausência de adubação, menores conteúdos deste íon na variedade tradicional em relação à melhorada, na fase inicial de desenvolvimento. O baixo conteúdo de amônio na variedade Piauí, supostamente, se deve a maiores aquisições e conseqüente acúmulo de NO_3^- , havendo, portanto menor redução de N, enquanto que na variedade IAC-47, a baixa redução de nitrato, provavelmente, se deve a menor aquisição deste íon, com conseqüente baixa redução para assimilação. Ao passar para a fase reprodutiva, os níveis de amônio se elevam na variedade Piauí, superando os encontrados na IAC-47, aos 15 DAA, chegando aos 30 DAA, ocorrendo o inverso, sugerindo que a variedade tradicional, sob condições de baixa disponibilidade de N, remobiliza de forma mais eficiente o nitrato acumulado, reduzindo-o, aparentemente, mais rápido nesta fase, para formação e enchimento dos grãos, enquanto que a variedade melhorada, parece apresentar um processo de remobilização mais lento, portanto, menos eficiente. Quando as plantas são submetidas a maiores níveis de nitrato, ambas as variedades elevam os teores de amônio nos tecidos, no entanto com maior incremento obtido pela variedade IAC-47 em todas as épocas de coleta, demonstrando, mais uma vez, ser uma variedade melhorada para responder a adubação, portanto, reduzindo mais NO_3^- .

Analisando os conteúdos de aminoácidos totais nas plantas apresentados na Tabela 4, observa-se, nos tratamentos sem adubação, maior conteúdo de N-amino livre na variedade Piauí em relação a IAC-47, na fase vegetativa e início do período reprodutivo. Este resultado corrobora com o obtido por SANTOS (2006a). O elevado conteúdo de aminoácidos no início de desenvolvimento, pode ter contribuído para o acúmulo de N-NO_3^- nos tecidos, uma vez que este íon e os produtos de sua redução influenciam na sua aquisição e redução, que por sua vez controlam a atividade da enzima nitrato redutase, conseqüentemente, estocando mais NO_3^- nos vacúolos (GLASS et al. 2002). Assim, os conteúdos de N-amino livre na parte aérea

da variedade tradicional, pode ser uma estratégia para o controle da atividade desta enzima, refletindo na maior eficiência desta variedade em adquirir e acumular NO_3^- quando submetida á condições de baixíssimas concentrações de nitrogênio na solução do solo. Sendo assim, maiores conteúdos de NO_3^- nos tecidos está relacionado também aos maiores conteúdos de N-amino livre, como demonstrado por SOUZA et al. (1999) e BUCHER (2007), para as mesmas variedades. Já os elevados conteúdos de aminoácidos obtidos por esta variedade, após a antese, indicam maior redução do NO_3^- acumulado, obtendo maior assimilação, se mostrando ser mais eficiente no processo de remobilização. Quando as plantas foram cultivadas sob adubação nítrica, ambas as variedades obtiveram aumento nos níveis de N-amino nos tecidos, no entanto, com superioridade na variedade IAC-47 em todas as épocas de coleta, com maiores incrementos, por se tratar de uma variedade melhorada para aumentar os níveis de produção, com o aumento do fornecimento de N, portanto, assimilando mais nitrogênio.

O conteúdo total de açúcares solúveis apresentado na Tabela 4, nos tratamentos sem adubação foram inferiores na variedade Piauí no início do ciclo, aos 35 DAT, em relação a IAC-47. Em vista, que os açúcares solúveis, além de ser fonte de energia, são fontes de esqueleto de carbono para a síntese de ácidos orgânicos para assimilação de N reduzido, assim, os elevados conteúdos de aminoácidos encontrados nesta fase na Piauí, justificam a queda nos conteúdos de açúcares solúveis. Além disso, essa redução implica na fosforilação da nitrato redutase, resultando na inativação desta enzima (KAISER & HUBER, 2001), portanto acumulando mais NO_3^- . Estes resultados estão de acordo com os de SANTOS et al. (2007) e BUCHER (2007). Na fase subsequente, aos 15 e 30 DAA, observa-se que a Piauí manteve níveis inferiores de açúcares, portanto, aparentemente, assimilando mais amônio. Quando as plantas receberam adubação, os níveis de açúcares solúveis aumentaram pelo aumento da demanda de produção de aminoácidos e outros processos metabólicos, em ambas as variedades, porém com maior incremento aos 35 DAT, na variedade IAC-47, por responder rapidamente a adubação, tendo que produzir grande quantidade de açúcares solúveis para atender a demanda de esqueletos de carbono para assimilação de N, diferentemente da Piauí, que pouco é afetada pela disponibilidade de N.

Tabela 4. Frações nitrogenadas e açúcares solúveis totais na parte aérea, aos 35 dias após transplântio (DAT), aos 15 e 30 dias após antese (DAA) de duas variedades de arroz, submetidas á dois níveis de N-NO₃⁻ (0 e 150 Kg N-NO₃⁻ .ha⁻¹).

N-NO ₃ ⁻ (Kg.ha-1)	Parte Aérea					
	35 DAT		15 DAA		30 DAA	
	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47
<i>N-NO₃⁻ (μmol. planta⁻¹)</i>						
0	349,95 Ba*	130,40 Bb	53,67 Ba	ND** Bb	40,48 Ab	70,19 Ba
150	4690,52 Ab	6004,57 Aa	97,75 Aa	7,43 Ab	60,67 Ab	131,54 Aa
<i>N-NH₄⁺ (μmol planta⁻¹)</i>						
0	40,97 Bb	48,15 Ba	43,72 Ba	26,21 Bb	23,43 Bb	44,14 Ba
150	117,09 Ab	159,67 Aa	57,72 Ab	97,58 Aa	52,83 Aa	52,89 Aa
<i>N-amino (μmol planta⁻¹)</i>						
0	190,82 Ba	175,42 Bb	130,33 Ba	74,95 Bb	78,20 Bb	100,47 Ba
150	636,51 Ab	1022,05 Aa	211,68 Ab	537,24 Aa	155,64 Aa	129,25 Ab
<i>Açúcares solúveis (g planta⁻¹)</i>						
0	0,29 Bb	0,41 Ba	0,04 Bb	0,32 Ba	0,29 Bb	0,58 Ba
150	0,37 Ab	1,05 Aa	0,7 Ab	1,49 Aa	0,89 Ab	1,25 Aa

* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste F a nível de 5% de significância.

** ND – não detectado.

4.3.2 N-Total

O teor de N-total, na fase vegetativa, aumentou nas variedades, Piauí e IAC-47, quando submetidas á maiores doses de nitrogênio na forma de nitrato (Figura 28). Resultado semelhante foi obtido por SABINO (2003). Nesta fase de crescimento inicial, sob ausência de adubação, maiores teores de N-total foram encontrados na variedade Piauí, tanto nas folhas inferiores, quanto na bainha+colmo. Em milho, BORGES et al. (2006), observou maior teor de N-total nas folhas de milho da variedade Sol da Manhã em relação a variedade melhorada, BRS 1010, no primeiro estágio vegetativo (32 DAG) sob menor dose de N. Já no período reprodutivo, aos 15 DAA, reduziram os teores de nitrogênio nessas duas partes das duas variedades, não havendo diferença entre as plantas, no entanto, na folha bandeira e folha 2, pode ser observada maior quantidade na variedade IAC-47, seguindo até o final do ciclo superior à Piauí (Figura 28). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por SOUZA (1995). Ao submeter às plantas á adubação nítrica, os maiores teores de N-total foram encontrados na variedade melhorada nas FI, sem diferença entre as variedades na B+C. Após a antese, aos 15 dias, a variedade IAC-47 apresentou superioridade no teor de nitrogênio em todas as partes da planta em relação a Piauí. Aos 30 DAA até o final do ciclo, reduziu-se o teor de N-total em ambas as variedades, não havendo diferença entre elas, com exceção da FB que se manteve superior na variedade Piauí.

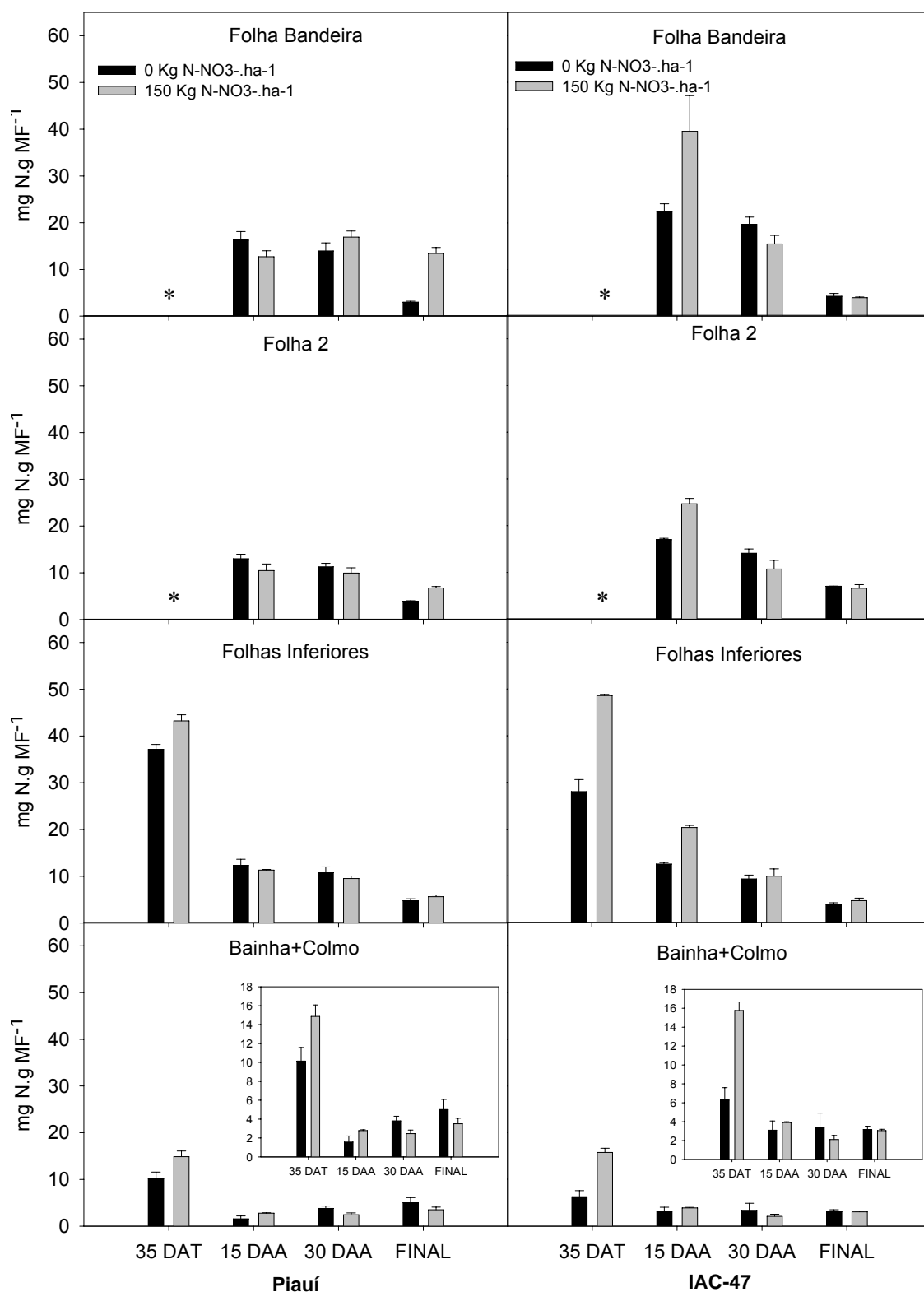


Figura 28. Teores de N-total ($\text{mg.g matéria seca}^{-1}$) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com $150 \text{ Kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

Na Tabela 5 pode ser observado o conteúdo de N-total por planta em cada tratamento, sendo possível um melhor entendimento do comportamento das variedades nas condições, as quais foram submetidas. Analisando as duas variedades nos tratamentos sem nitrato, aos 35 DAT, a variedade Piauí apresentou maiores quantidades de N-total em relação a IAC-47, indicando maior capacidade de acúmulo de N na fase inicial de desenvolvimento. De maneira inversa ao observado na fase anterior, aos 15 DAA, a variedade tradicional se encontra com menor conteúdo de nitrogênio em relação à variedade melhorada, reduzindo ainda mais até os 30 DAA, diferentemente da IAC-47 que tende a aumentar até esta época. Segundo PEREZ et al. (1973) e NORMAN et al. (1972), as lâminas foliares são as principais fontes de N remobilizado (58%) para os grãos, seguidas pelas bainha+colmo (28%). Sendo assim, a perda de N da parte vegetativa no período reprodutivo confere a variedade Piauí maior eficiência em utilizar o N acumulado inicialmente. Esses resultados corroboram com os encontrados por SOUZA (1995), a qual observou maior perda de N da parte vegetativa (FB e F2) na variedade Piauí em relação a IAC-47. A perda de maior quantidade de nitrogênio da parte vegetativa da variedade tradicional pode ser responsável pelo maior acúmulo de N nos grãos, diferentemente da variedade melhorada, na qual o crescimento reprodutivo pode estar competindo com o crescimento vegetativo, portanto a FB e F2 podem estar sendo um dreno para o N, em detrimento do acúmulo de N nos grãos. Quando as plantas foram submetidas às maiores doses de N, ambas as variedades obtiveram aumento no conteúdo de N-total, entretanto com maiores incrementos por parte da variedade IAC-47, pela maior resposta à adubação. A quantidade de nitrogênio se manteve superior na variedade melhorada em todas as fases do ciclo.

Tabela 5. N-total aos 35 dias após transplântio (DAT), aos 15 e 30 dias após antese (DAA) de duas variedades de arroz, submetidas à dois níveis de $N-NO_3^-$.

N-NO ₃ ⁻ (Kg.ha ⁻¹)	Parte Aérea					
	35 DAT		15 DAA		30 DAA	
	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47	Piauí	IAC-47
	<i>N-Total (mg planta⁻¹)</i>					
0	328,6 Ba*	302,37 Bb	125,57 Bb	133,68 Ba	118,54 Bb	191,88 Aa
150	789,67 Ab	1069,21 Aa	207,65 Ab	624,13 Aa	169,69Ab	196,46 Aa

* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula nas colunas e minúsculas nas linhas, não diferem entre si pelo teste F a nível de 5% de significância.

4.3.3 Atividade da enzima Nitrato Redutase

A atividade da Nitrato Redutase comparada ao teor de NO_3^- (Figura 24) apresenta diferença de comportamento entre as variedades (Figura 29).

Na fase vegetativa, a nitrato redutase (NR) apresentou atividade na bainha+Colmo inferior as folhas inferiores, nas duas variedades, em ambas as doses de NO_3^- , caracterizando este tecido como especializado em armazenar NO_3^- , amido e açúcar, diferentemente das folhas que são órgãos fotossinteticamente ativos responsáveis pela redução e assimilação de nitrogênio. Semelhantes resultados foram obtidos por SANTOS (2006a) e BUCHER (2007). Nesta fase, na ausência de adubação nítrica, a NR apresentou baixa atividade, não havendo diferença entre as variedades estudadas, entretanto, a Piauí manteve maiores níveis de NO_3^- nos tecidos em relação a IAC-47. O mesmo foi observado por SANTOS et al. (2007) para as mesmas variedades, aos 56 DAG.

A enzima NR é induzida (síntese “de novo”) pelo substrato (NO_3^-), sendo assim, a aquisição deste íon aumenta a sua atividade, no entanto, os produtos da assimilação do nitrogênio, associados à rápida passagem do NO_3^- para o vacúolo, reduzem a atividade desta enzima (feedback negativo) (GLASS et al., 2002). Sendo assim, os resultados obtidos, reforçam a indicação de que na fase inicial de desenvolvimento, a variedade tradicional apresenta maior capacidade de aquisição e acúmulo de NO_3^- , portanto, obtendo menor atividade desta enzima, diferentemente da variedade melhorada, na qual a baixa atividade da nitrato redutase pode não estar associada ao maior acúmulo de nitrato e sim, supostamente, à menor aquisição deste íon durante esta fase e rápida assimilação do N para crescimento e desenvolvimento. Nestas circunstâncias, aparentemente a capacidade da Piauí em adquirir nitrato e a baixa atividade da nitrato redutase, em estágio inicial de crescimento, podem ser os mecanismos que fazem com que esta variedade apresente um aumento da produção de N nos grãos (RODRIGUES et al., 2004). Após a antese, ocorreu uma queda na atividade da nitrato redutase nas folhas inferiores de ambas as variedades estudadas, por se encontrarem mais velhas, direcionando atividade nas folha bandeira e folha 2, que são folhas mais jovens, portanto fotossinteticamente mais ativas. Aos 15 DAA, foi observada maior atividade da nitrato redutase na variedade Piauí na folha 2, associada a maiores teores de NO_3^- presentes na folha bandeira e folha 2 nesta variedade, indicando maior remobilização do NO_3^- para esses tecidos, com maior assimilação, o que difere da IAC-47, na qual a atividade da nitrato redutase, aparentemente, consumiu todo o nitrato que se encontrava em baixa quantidade. Aos 30 DAA, ocorreu um aumento da atividade na variedade tradicional.

Com o suprimento de nitrato, aos 35 DAT, a variedade Piauí apresentou a mesma atividade da NR na bainha+colmo, conseqüentemente favorecendo o acúmulo elevado de NO_3^- nesse órgão, porém quando observada as folhas inferiores, nota-se o aumento da atividade da nitrato redutase e de teores de NO_3^- (Figura 29). Diante deste comportamento, se sugere que a variedade Piauí, quando em condições de alta disponibilidade de NO_3^- no solo, além da capacidade de estocar o nitrato no vacúolo da bainha na fase vegetativa, ela reduz o excesso de NO_3^- disponível durante a fase vegetativa para produção de aminoácidos para crescimento e desenvolvimento, produzindo mais perfilhos, como observados na Figura 19. Quanto a variedade IAC-47, houve um aumento na atividade da NR, com o aumento da dose de N, diferindo da Piauí apenas nas FI, apresentando menor atividade. É provável que o elevado teor de NO_3^- na bainha+colmo associado à baixa atividade da nitrato redutase na variedade melhorada, esteja relacionado à elevada aquisição de NO_3^- nesta fase, direcionada para as folhas e então reduzidos pela NR. Ao entrar na fase reprodutiva, essa variedade também apresentou maior atividade da NR em relação a Piauí, o que possivelmente é decorrente da aquisição de nitrogênio do solo nesta época ou remobilização do nitrato das raízes, por ter apresentado redução no teor de nitrato aos 15 DAA e aumentado aos 30 DAA.

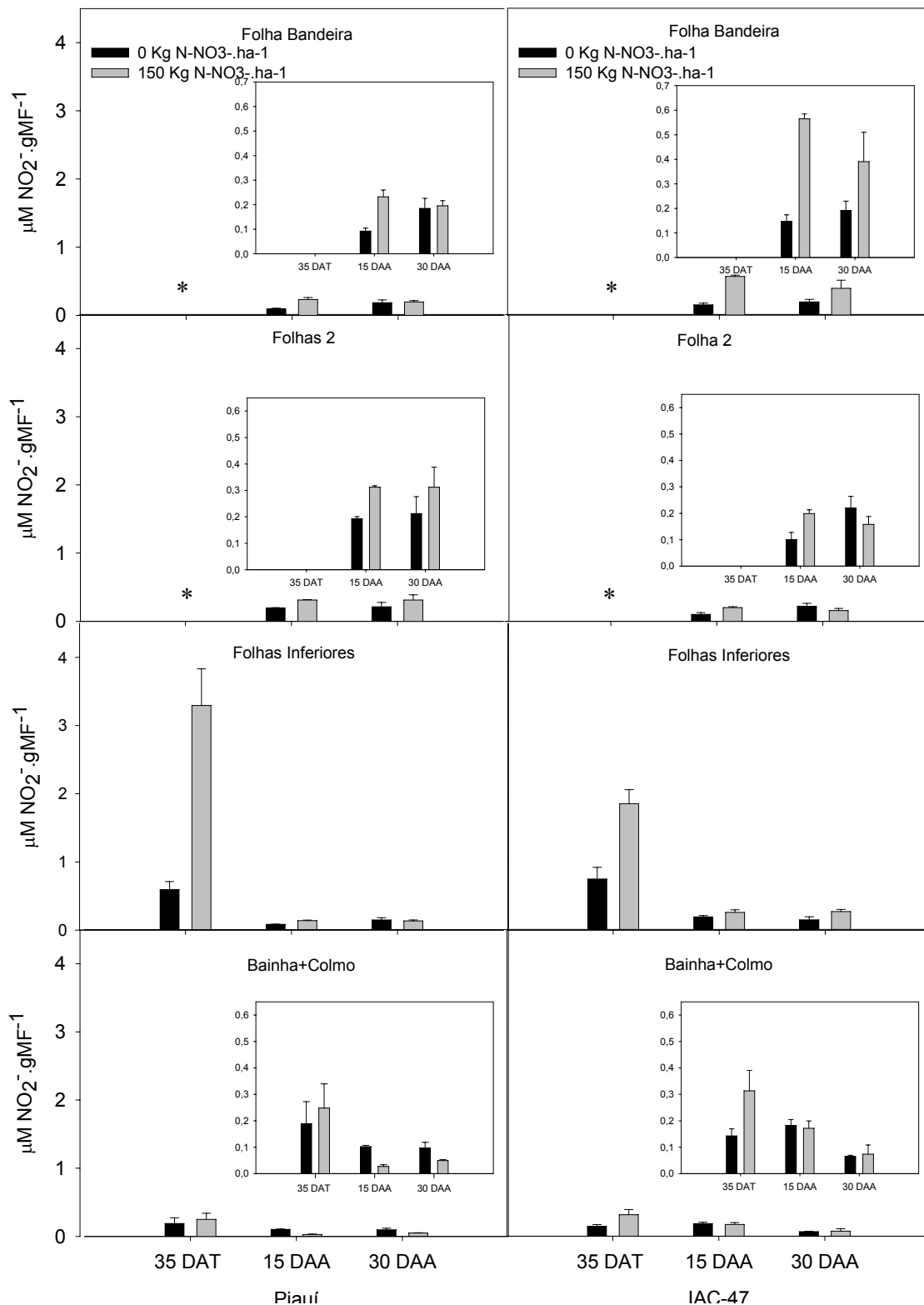


Figura 29. Atividade da Nitrato Redutase ($\mu\text{M NO}_2^- \cdot \text{g massa fresca}^{-1}$) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com $150 \text{ Kg N-NO}_3^- \text{ ha}^{-1}$. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

4.3.4 Atividade das enzimas P-H⁺-ATPase, V-H⁺-ATPase e H⁺-Ppase

As bombas de prótons da plasmalema da parte aérea, as P-H⁺-ATPases, são enzimas responsáveis pela geração de gradiente eletroquímico necessários ao transporte de nutrientes por meio do processo de carregamento e descarregamento do xilema e floema (SONDERGAARD et al., 2004). Neste sentido, o envio de NO₃⁻ para a parte aérea é dependente dessas bombas de próton. Sendo assim, sugere-se que durante a fase vegetativa, em condições de baixa fertilidade, a maior atividade das P-H⁺-ATPases observada nas Bainha+Colmo, seguida das folhas inferiores, na variedade Piauí (Figura 30), pode ter contribuído para um maior direcionamento de nitrato para estes tecidos, como observado anteriormente, principalmente para Bainha+Colmo que é o principal tecido de reserva, com conseqüente maior acúmulo deste íon nesta variedade tradicional em relação a variedade melhorada. Quando se aumentou a disponibilidade de nitrogênio, a variedade Piauí manteve praticamente a mesma atividade na planta toda, enquanto que a variedade IAC-47 superou essa variedade na Bainha+Colmo na fase vegetativa. As maiores atividades das bombas de próton da plasmalema, sob a maior dose de N, provavelmente, se deve ao fato da variedade IAC-47 ser melhorada para responder á níveis de adubação mais elevados, translocando maiores quantidades de NO₃⁻ para a parte aérea para assimilação. Chegando a fase reprodutiva, sob as duas doses de nitrato, ambas as variedades apresentaram redução da atividade das P-H⁺-ATPases na Bainha+Colmo, no entanto maiores atividades foram observadas na folha bandeira e folha 2 na variedade Piauí em comparação a IAC-47, aos 15 DAA. Sugere-se que a atividade das P-H⁺-ATPases na variedade Piauí se desloca da Bainha+Colmo para as folha bandeira e folha 2 resultando em uma maior translocação de nitrato acumulado inicialmente, para as folhas mais jovens na fase de formação e enchimento dos grãos, por meio do processo de carregamento e descarregamento do xilema e floema promovidos pelas P-H⁺-ATPases. Já a variedade melhorada apresentou aumento da atividade desta bomba de prótons aos 30 DAA, quando os grãos já se encontravam em fase de amadurecimento, mostrando-se menos eficiente no processo de enchimento dos grãos.

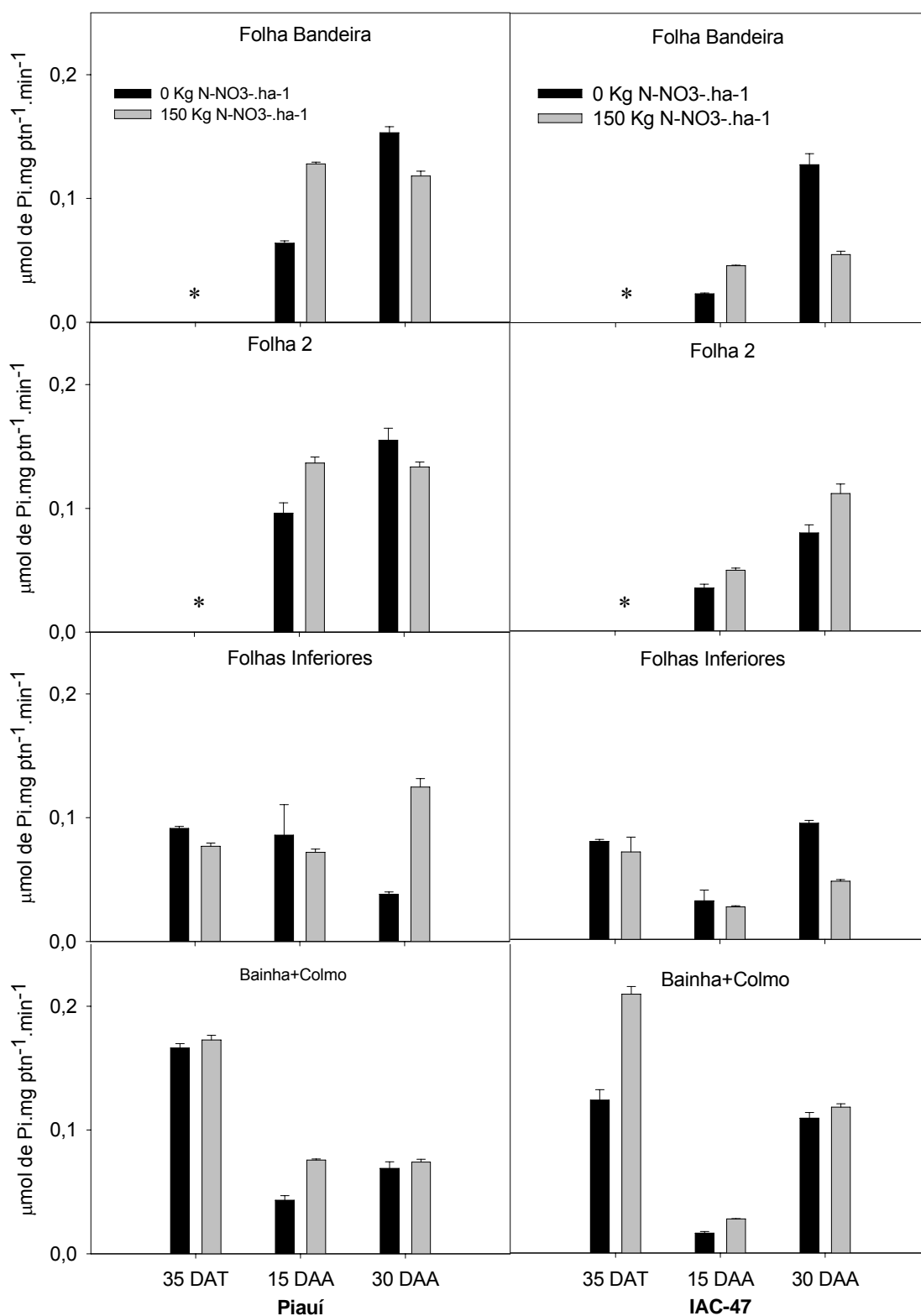


Figura 30. Atividade da P-H⁺-ATPase ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1}\text{ptn}^{-1}\text{.min}^{-1}$) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

As H^+ -PPases são bombas de prótons mais utilizadas em fase de crescimento intenso, onde há grandes processos de biossíntese com liberação de muito PPi. Assim, esta enzima reaproveita esses PPi liberados, para bombear prótons, economizando ATP que está sendo utilizado para síntese de novas moléculas e outros processos metabólicos. Recentes estudos têm mostrado que as H^+ -PPases exercem um efeito indireto no processo de expansão e divisão celular, por promover o transporte de solutos para o interior do vacúolo (GAXIOLA et al., 2002 e SANTOS, 2006a), o que justifica a alta atividade observada em ambas as variedades durante a fase vegetativa (Figura 31). Nesta fase, sob a ausência de adubação, não houve diferença na atividade desta enzima entre as variedades nos dois tecidos da planta, obtendo maior atividade desta bomba de próton na B+C. Quando as variedades são adubadas há um aumento significativo na atividade da enzima nas FI das duas variedades, entretanto, não havendo diferença entre as plantas.

As H^+ -PPases, também são tidas, geralmente, como bombas de prótons auxiliares as $V-H^+$ -ATPases quando o suprimento energético está baixo (SANTOS, 2006a). Sendo assim, ao entrar na fase reprodutiva, a atividade desta enzima decresce pela diminuição da liberação de seu substrato, PPi, que já não está sendo tão intensamente produzido. Mesmo assim, a variedade IAC-47 apresentou maiores atividades quando comparada à variedade Piauí em todos os tecidos da planta, em ambas as doses de N (Figura 31). Essa maior atividade pode ser resultado de um suprimento energético baixo ou uma estratégia de conseguir junto a $V-H^+$ -ATPases criar maior gradiente para remobilização do pouco nitrato acumulado, ou até mesmo pelo fato de as folhas se encontrarem mais jovens e conseqüentemente mais ativas, como observado na Figura 21.

Na fase inicial de desenvolvimento, aos 35 DAT, não houve diferença entre os tratamentos quanto à atividade das $V-H^+$ -ATPases, apresentando baixa atividade (Figura 32), uma vez que a presença de nitrato funciona como um ânion caotrópico para as V -ATPases, causando um desligamento entre os domínios integral e periférico desta proteína tornando-a incapaz de hidrolisar ATP e translocar prótons, inativando a enzima (FINBOW & HARRISON, 1997) Dessa forma, as V -ATPases não funcionam quando há grandes quantidades de NO_3^- no citosol, priorizando desta forma o acúmulo deste nutriente (SANTOS, 2006). Já na fase reprodutiva, maior atividade das $V-H^+$ -ATPases foi encontrada na variedade Piauí, aos 15 DAA, em relação a IAC-47, em ambas as doses de N, ocorrendo o inverso aos 30 DAA. Como as $V-H^+$ -ATPases são tidas como bombas de H^+ vacuolares responsáveis pela geração de um gradiente eletroquímico, viabilizando a remobilização do NO_3^- (SOUZA & FERNANDES, 2006), o aumento da atividade desta enzima, aliada ao aumento dos teores de nitrato nas folhas mais jovens da variedade tradicional, indicam que esta variedade apresenta um processo de remobilização de NO_3^- , mais rápido no início do período reprodutivo, sendo portanto mais eficiente neste processo, diferentemente da variedade melhorada, que apresentou um processo de remobilização mais lento, portanto menos eficiente.

Com os resultados obtidos, sugere-se que as H^+ -PPases atuam na fase de maior influxo de NO_3^- (desfavorável as $V-H^+$ -ATPases), e as $V-H^+$ -ATPases, atuam mais em fases posteriores, quando a circulação de nitrato no citosol deve ser menor, e a remobilização a partir do vacúolo maior.

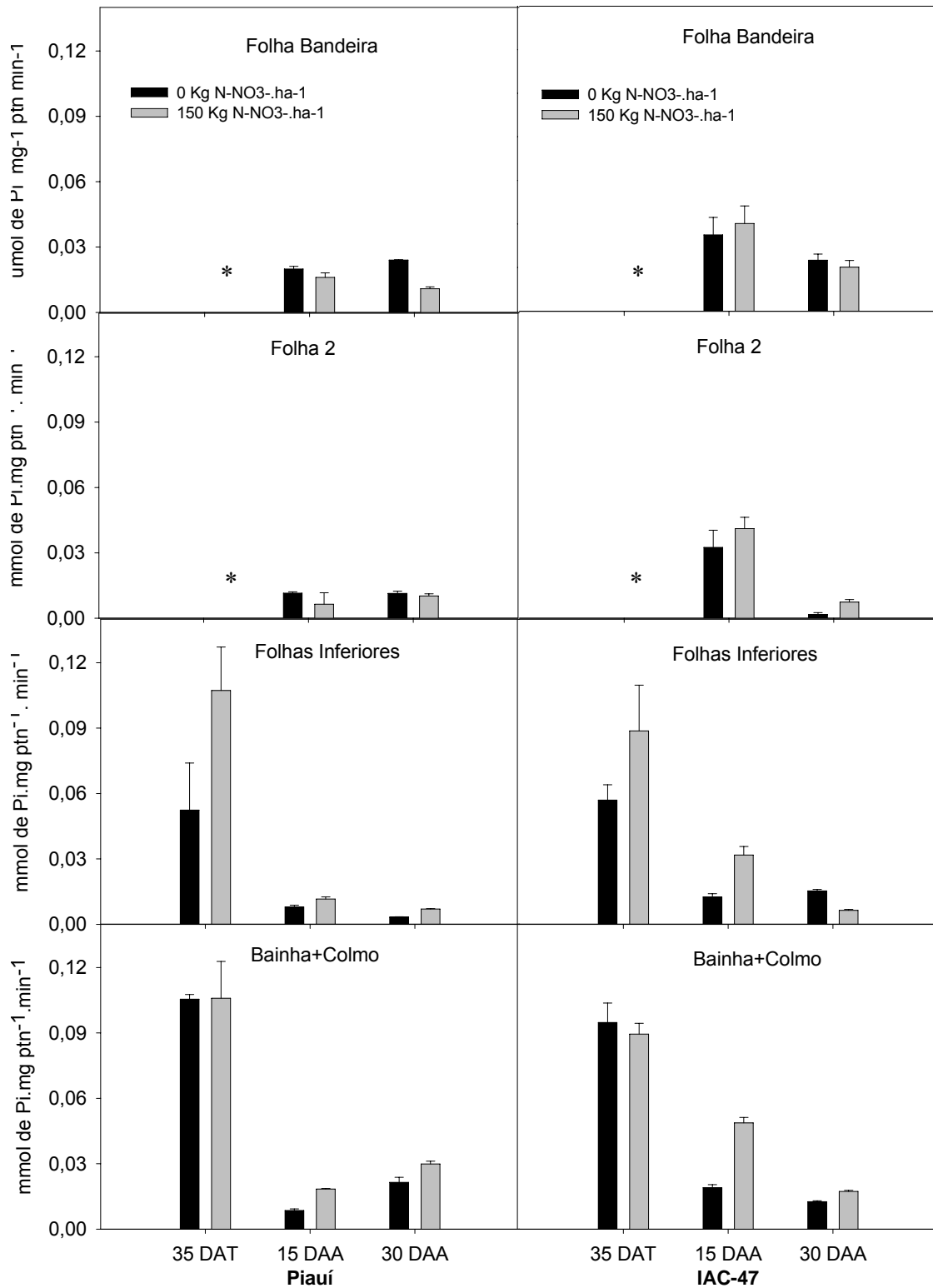


Figura 31. Atividade da H⁺-PPase ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1}\text{ptn.min}^{-1}$) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

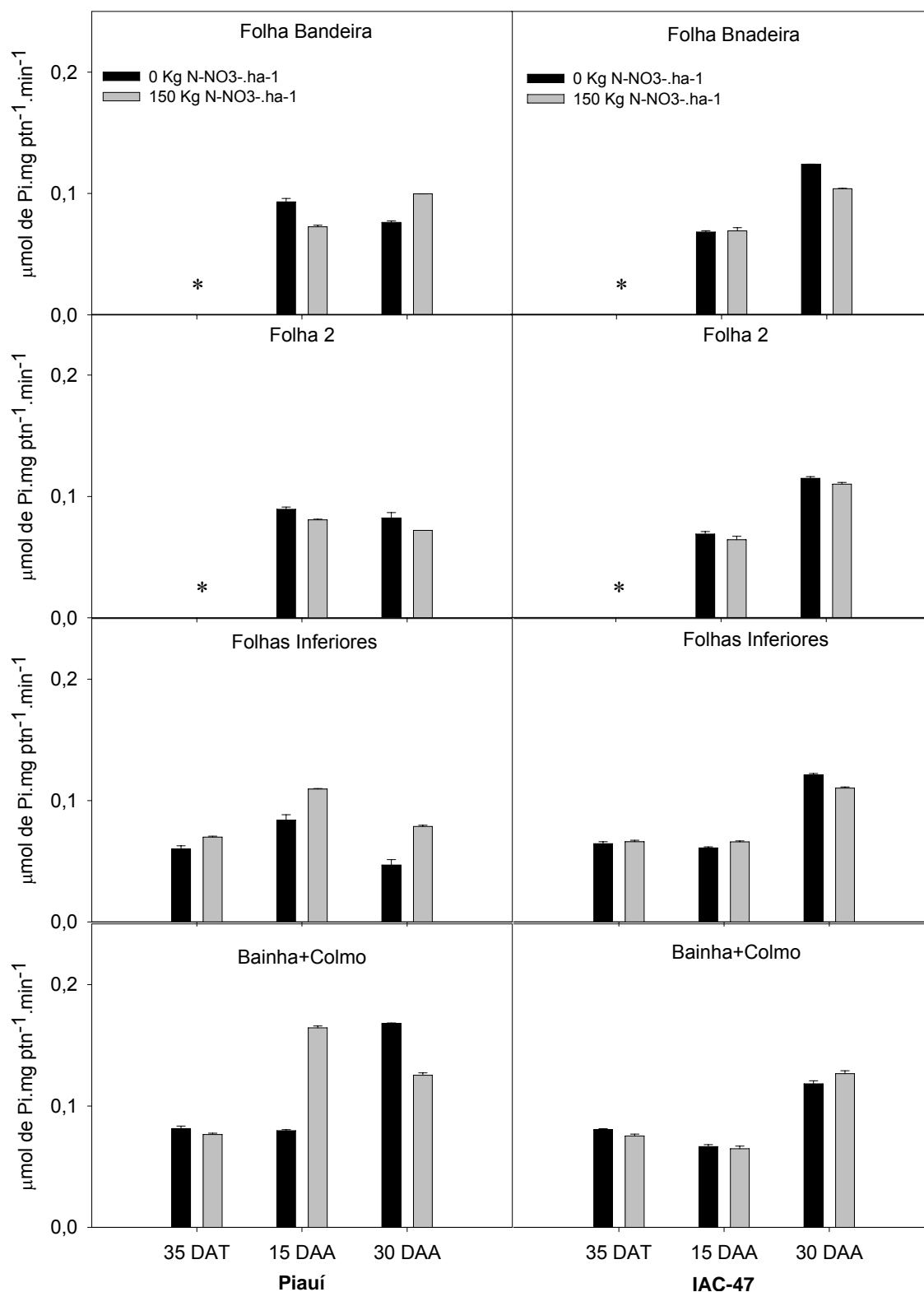


Figura 32. Atividade da V-H⁺-ATPase ($\mu\text{mol Pi mg}^{-1}\text{ptn}^{-1}\text{.min}^{-1}$) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

4.3.5 Atividade da enzima Glutamina Sintetase

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima responsável pela assimilação de NH_4^+ , catalisando a reação entre este íon e glutamato formando glutamina, com gasto de ATP (SOUZA & FERNANDES, 2006). Portanto, na fase inicial de crescimento, a menor atividade encontrada na Bainha +colmo em comparação as folhas inferiores, em todos os tratamentos (Figura 33), enfatiza que estes tecidos são especializados para o acúmulo de nitrato, apresentando pouca assimilação de N. Resultados semelhantes foram obtidos por SOUZA (1995), SANTOS (2006b) e BUCHER (2007). Aos 35 DAT, dentre as variedades estudadas submetidas á ausência de adubação nítrica, a atividade da GS foi maior na variedade Piauí (Figura 33). Este resultado pode revelar uma estratégia desta variedade para reduzir a atividade da nitrato redutase pelo produto formado da assimilação de N pelo ciclo GS/GOGAT, tendo como consequência, maior acúmulo de nitrato.

Quando as variedades foram adubadas, a IAC-47 teve aumento significativo na atividade da GS em ambas as partes da planta, folhas inferiores e Bainha+Colmo, enquanto que a variedade Piauí, não foi afetada pelo aumento da dose de N. Na fase reprodutiva, em todos os tecidos das plantas de todos os tratamentos houve redução acentuada na atividade da GS, provavelmente, devido ao fato, de na fase vegetativa, as plantas estarem em crescimento acelerado, na qual a demanda por aminoácidos é mais elevada e os tecidos se encontram mais jovens, portanto mais fotossinteticamente ativos, diferentemente da fase reprodutiva, onde as plantas se encontram na fase final de ciclo com maior degradação da GS pelas enzimas proteolíticas, servindo como fonte de N para os grãos. SOUZA (1995), também observou em plantas de arroz das mesmas variedades, maior atividade da GS antes da antese. Aos 15 DAA, a GS apresentou maior atividade na variedade Piauí sob as duas doses de N, com maiores atividades sem adubação. Maiores atividades da GS foram observadas na folha bandeira e folha 2, com superioridade na folha bandeira por ser um tecido menos senescente que a folha 2, que já está totalmente madura.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos por SOUZA (1995). Aos 30 DAA, houve redução na atividade da GS na variedade Piauí, provavelmente, pela maior degradação desta enzima para fornecimento de N, enquanto que a variedade IAC-47, obteve aumento, o que não é muito vantajoso nesta fase do ciclo da cultura, já que os grãos se encontram em estágio de maturação. Sendo assim, esses dados sugerem que a variedade tradicional, após a antese, sob condições de baixa disponibilidade de N, apresenta maior capacidade de assimilação de N, usando de forma mais eficiente o nitrato acumulado inicialmente em relação à variedade melhorada.

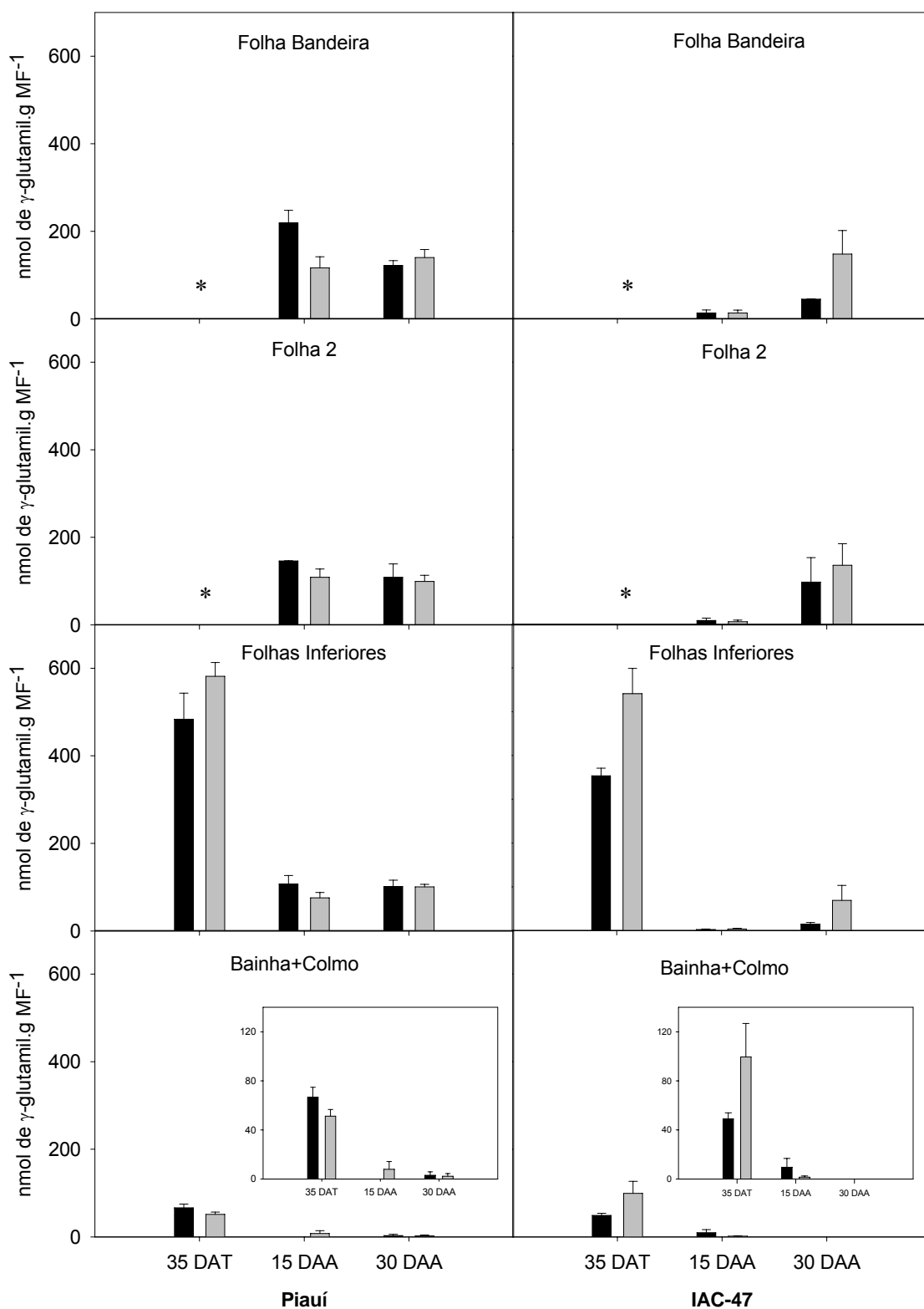


Figura 33. Atividade da Glutamina Sintetase (nmol de γ -glutamyl.g massa fresca⁻¹) da folha bandeira, folha 2, folhas inferiores e bainha+colmo de duas variedades de arroz, Piauí e IAC-47, sem e com 150 Kg N-NO₃⁻ ha⁻¹. DAT- Dias Após o Transplante; DAA – Dias Após Antese. *Aos 35 DAT, as plantas ainda não possuíam folha bandeira e folha 2.

4.4 Caracterização morfológica e quantitativa dos grãos

4.4.1 Morfologia e peso dos grãos

Na Tabela 6 estão apresentados os dados referentes aos grãos das duas variedades de arroz estudadas, sob as duas doses de nitrogênio na forma de nitrato. As variedades foram classificadas conforme descrito no material e métodos.

Tabela 6. Espessura, comprimento, largura, relação comprimento largura e peso de mil grãos das variedades de arroz (Piauí e IAC-47), com ou sem adubação de 150 Kg N-NO₃⁻.ha⁻¹.

VARIEDADE	ADUBAÇÃO (Kg N-NO ₃ ⁻)	E	C	L	C/L	PMG
PIAUI	0	2,00	5,67	3,00	1,89 Ab	28,87 Ab
PIAUI	150	1,91	5,83	2,93	2,00 Ab	28,62 Ab
IAC-47	0	1,99	7,11	2,74	2,60 Aa	34,89 Aa
IAC-47	150	2,07	6,90	2,68	2,57 Aa	33,96 Aa

E = espessura (mm); C = comprimento (mm); L = largura (mm); C/L = relação comprimento e largura; PMG = peso de mil grãos (g).

* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula entre doses de nitrato e minúsculas entre variedades, não diferem entre si pelo teste F a nível de 5% de significância.

Avaliando o comprimento e espessura dos grãos e a relação comprimento largura, pode-se classificar a variedade Piauí como grão do tipo médio e forma semi-arredondada e a variedade IAC-47 como grão do tipo longo e forma meio alongada, independente da adubação (Figura 34).

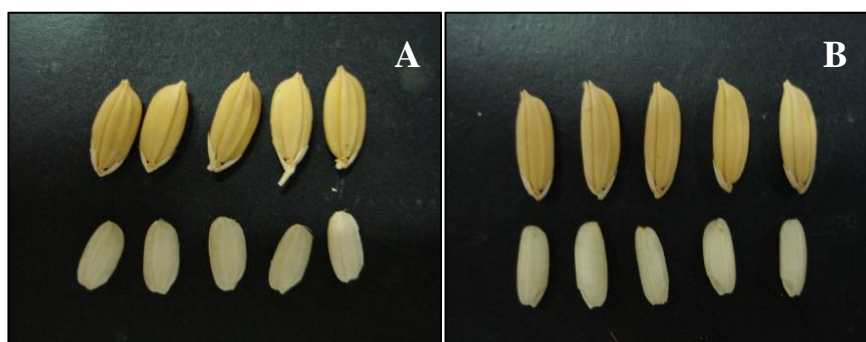


Figura 34. Característica morfológica dos grãos de arroz. (A) Grãos da variedade Piauí (tipo médio e forma semi-arredondada); (B) Grãos da variedade IAC-47 (tipo longo e forma meio alongada).

Não houve efeito da adubação no peso médio de mil grãos em ambas as variedades e o maior valor foi observado nos grãos da variedade IAC-47 (Tabela 6).

4.4.2 Acúmulo de proteína nos grãos

Os teores de proteína bruta dos grãos da variedade Piauí e IAC-47 e suas respectivas frações protéicas: glutelina, albumina+globulina e prolamina, podem ser observados na Figura 35.

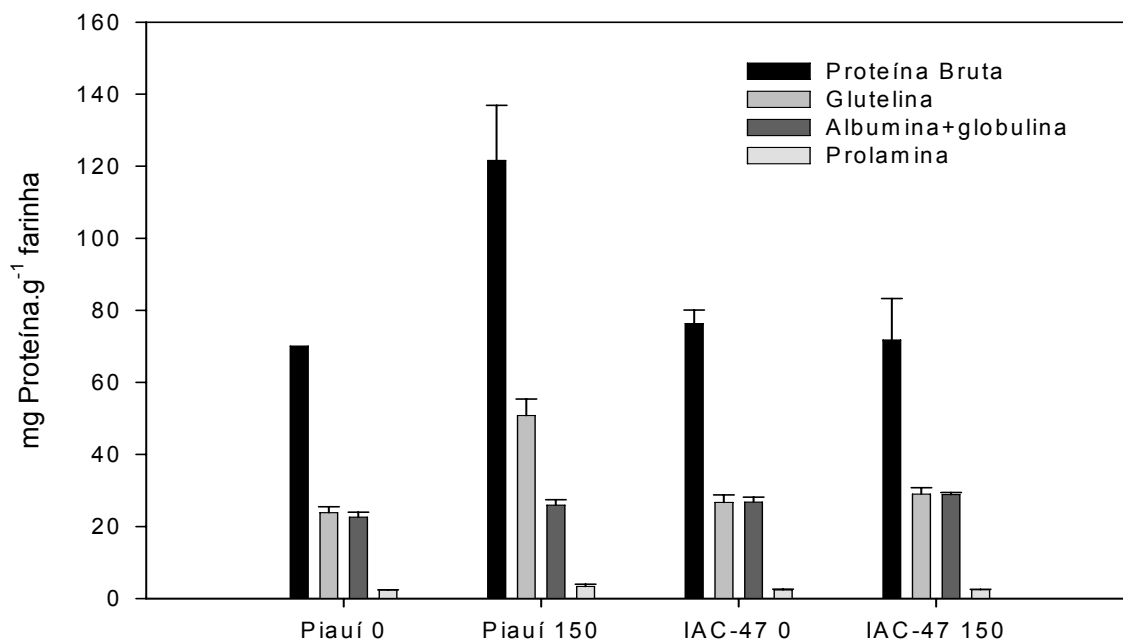


Figura 35. Teores de proteína bruta e frações protéicas (glutelina, albumina+globulina e de prolamina) (mg de proteína . g farinha⁻¹) dos grãos de duas variedades de arroz (Piauí e IAC-47) com ou sem adubação de 150 Kg N-NO₃⁻.ha⁻¹.

Em ambas as variedades de arroz, os grãos apresentaram maiores teores de glutelina em relação ao de prolamina, conforme esperado para o arroz, confirmando ser um cereal de grande valor protéico em relação aos demais cereais, uma vez que outros cereais, como o milho e o trigo, apresentam como principal proteína a prolamina, apresentando menor qualidade nutricional do grão (LÁSZTITY, 1986). O mesmo foi verificado em grãos de arroz por SOUZA et al., 1995, FERRAZ JUNIOR et al., 2001 e ARAÚJO, 2002.

Tabela 7. Produção de grãos (totais e cheios) por vaso das variedades de arroz (Piauí e IAC-47), com ou sem adubação de 150 Kg N-NO₃⁻.ha⁻¹.

VARIETADE	TRATAMENTO (Kg N-NO ₃ ⁻ .ha ⁻¹)	GRÃOS.VASO ⁻¹	GRÃOS CHEIOS.VASO ⁻¹
PIAUI	0	483 Aa	296 Aa*
PIAUI	150	331 Bb	27 Bb
IAC-47	0	238 Bb	205 Bb
IAC-47	150	681 Aa	419 Aa

* Médias seguidas de mesma letra, maiúscula entre doses de nitrato e minúsculas entre variedades, não diferem entre si pelo teste F a nível de 5% de significância.

No tratamento sem nitrato, não houve diferença nos teores de proteína bruta e suas frações protéicas entre as duas variedades (Figura 35), no entanto, a variedade Piauí apresentou maior produção de grãos (296 grãos cheios.vaso⁻¹) em relação a IAC-47 (205 grãos cheios.vaso⁻¹), porém avaliando a produção total de grãos (grãos cheios + grãos chochos), a variedade Piauí teve o dobro da produção (483 grãos.vaso⁻¹) da IAC-47 que apresentou apenas 238 grãos.vaso⁻¹ (Tabela 7). Esses resultados indicam que a variedade tradicional, em solos com menor disponibilidade de N, apresenta maior eficiência no uso de nitrogênio, ou seja, maior produção de grãos com baixo uso de nitrogênio. Certamente, as variedades de arroz que elevam a produtividade com menor uso de insumos, serão mais adotadas pelos produtores rurais. FERRAZ JUNIOR et al. (2001) observaram em 10 variedades do Maranhão, dentre elas a Piauí, classificadas como variedades com elevado teor de proteína, menor teor de proteína bruta e maior produção de grãos nos controles quando cultivadas em Seropédica-RJ. Esse resultado foi atribuído a maior intensidade luminosa e as altas temperaturas em relação ao Estado do Maranhão. Quando adubadas com nitrogênio via foliar, estas variedades apresentaram um aumento no teor de proteína bruta e diminuição da produção.

Nos tratamentos que receberam 150 Kg N-NO₃⁻.ha⁻¹, a variedade IAC-47 dobrou de produção (419 grãos cheios.vaso⁻¹) e triplicou a produção total de grãos (681 grãos.vaso⁻¹) (Tabela 7), porém manteve os mesmos teores de proteína (Figura 35). Esse aumento de produção foi obtido por ser uma variedade melhorada para responder á adubação. O mesmo não foi observado na variedade Piauí, uma vez que apresentou produção total de 331 grãos.vaso⁻¹, porém com grande número grão chochos, resultando na produção de apenas 27 grãos cheios.vaso⁻¹ (Tabela 7). Sendo assim, este tratamento apresentou elevado teor de proteína bruta e glutelina, já que havia poucos drenos. PATRICK & HOGKINS (1974), observaram que a aplicação de nitrogênio antes da antese, causou um aumento no teor de proteína, mas diminuiu a produção de grãos de arroz.

O que pode ter originado a formação de “grãos chochos” são as altas temperaturas acima de 35°C registradas nesse período de emissão das panículas associada às altas intensidades luminosas ou até mesmo pela presença de percevejo observada durante o experimento, principalmente nos tratamentos que receberam adubação, por apresentarem maior número de perfilhos. Como o número de dias de ciclo entre as variedades foi diferente, a variedade Piauí, com 150 dias de ciclo, foi submetida a estresses mais severos que a IAC-47 que completou seu ciclo com 110 dias, portanto, produzindo maior número de grãos chochos, obtendo menor produtividade.

As elevadas temperaturas, tanto diurnas quanto noturnas, durante o período de emissão das panículas da variedade Piauí (Tabela 2), parece ser o principal fator responsável pela menor produção de grãos dessa variedade.

De acordo com JULIANO (1985), os níveis de proteína bruta nos grãos de arroz podem variar em torno de 7 pontos percentuais devido às mudanças nas condições ambientais.

Analisando o teor de nitrogênio total nos grãos cheios, grãos chochos, na palha dos grãos cheios e na ráqui (Figura 36), nota-se nos tratamentos sem adubação, um comportamento semelhante entre as variedades, no entanto com teores de N-total nos grãos chochos maiores na variedade Piauí em comparação a IAC-47. Já nos tratamentos que receberam adubação, a IAC-47 aumentou o teor de N apenas nos grãos chochos, enquanto que a Piauí aumentou os teores de N-total tanto nos grãos cheios quanto nos grãos chochos, sendo superior a IAC-47.

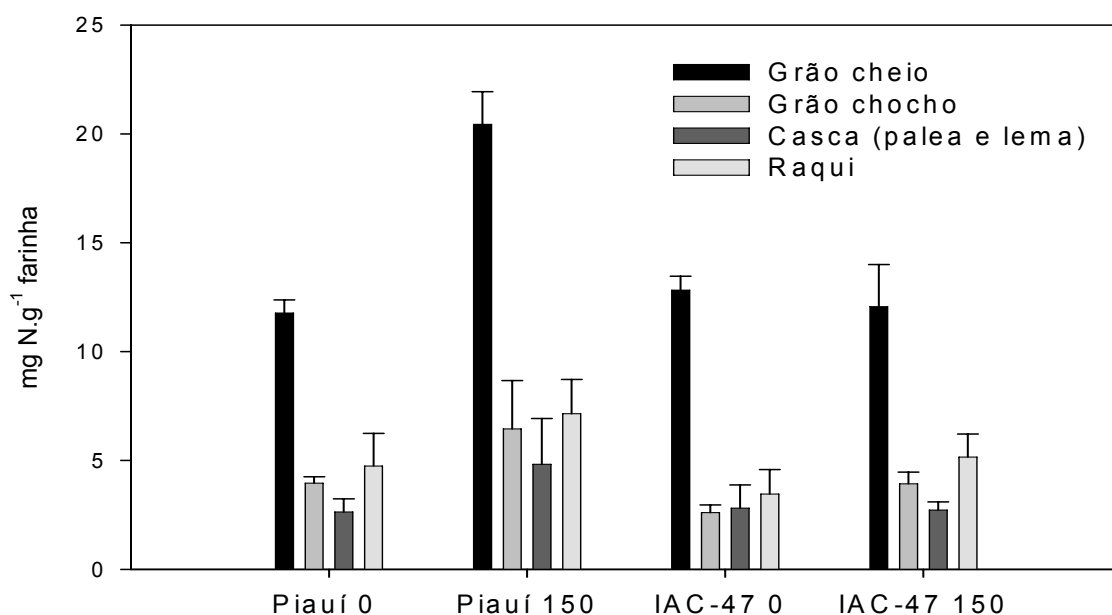


Figura 36. Teores de N-total (mg g farinha^{-1}) dos grãos cheios, grãos chochos, casca (palea e lema) dos grãos cheios e ráquis de arroz de duas variedades (Piauí e IAC-47) com ou sem adubação de $150 \text{ Kg N-NO}_3^- \cdot \text{ha}^{-1}$.

Na Figura 37 pode-se observar uma correlação positiva entre o teor de proteína bruta e de glutelina, enfatizando que o aumento da proteína bruta no grão de arroz é acompanhado do aumento da fração glutelina que apresenta maior valor nutricional, enquanto que no milho, por exemplo, o aumento na proteína bruta é acompanhado de aumentos nos teores de prolamina, o que leva a uma diminuição da qualidade nutricional do grão, pois essa fração apresenta menor teor de aminoácidos essenciais. Como também observado por SOUZA (1990), SOUZA et al. (1993), FERRAZ JUNIOR et al. (2001) e ARAÚJO et al. (2006).

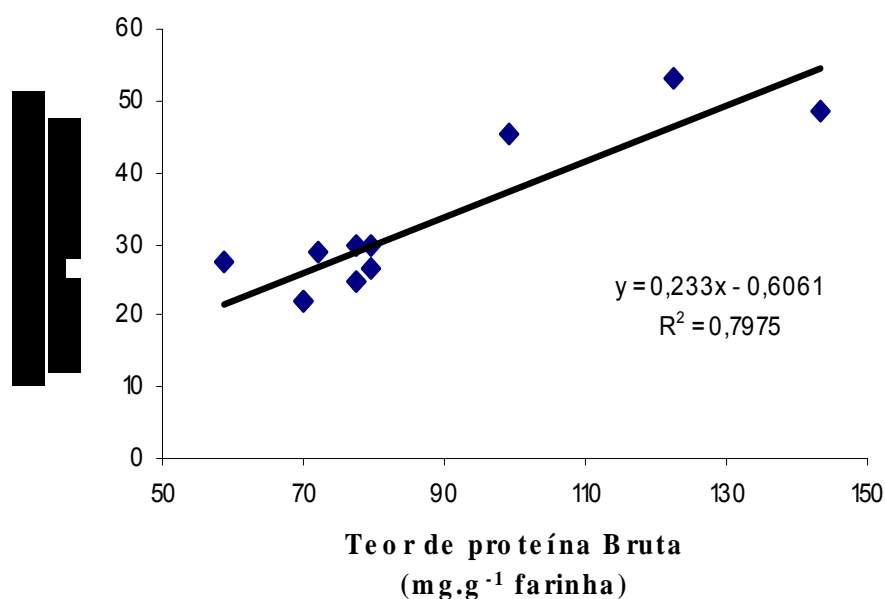


Figura 37. Relação entre o teor de proteína bruta e o teor de glutelina ($\text{mg . g farinha}^{-1}$) dos grãos de arroz.

5 CONCLUSÃO

I- FASE VEGETATIVA

As plantas da variedade Piauí apresentam uma maior eficiência no processo de acúmulo de nitrato em relação as da variedade IAC-47, quando cultivadas em condições de baixa disponibilidade de nitrogênio, na fase inicial de crescimento, principalmente nas bainhas e colmos. A maior eficiência atribuída à variedade tradicional, pode ser resultado de uma estratégia adotada por estas plantas, que, em detrimento ao crescimento vegetativo, acumula uma maior quantidade de nitrogênio na forma solúvel (NO_3^-) e estrutural (N-protéico e outros). Já a variedade melhorada, utiliza rapidamente o N absorvido para o desenvolvimento vegetativo, tornando-se mais vulnerável a ocorrência de deficiência na fase reprodutiva.

II- FASE REPRODUTIVA

A variedade Piauí apresenta maior eficiência no processo de remobilização do NO_3^- , em relação à variedade IAC-47, sob condições de baixa disponibilidade de nitrogênio. Essa observação pode ser explicada pela maior atividade das V- H^+ -ATPases encontradas na variedade tradicional, no início do período reprodutivo e uma menor quantidade de nitrogênio, tanto na forma solúvel (NO_3^-), quanto estrutural (N-protéico e outros), no final do ciclo. Diferentemente da variedade IAC-47, que completou seu ciclo com maior conteúdo de N- NO_3^- e N-total remanescentes, sugerindo uma remobilização menos eficiente.

III – PROTEÍNA NOS GRÃOS

A variedade Piauí apresentou maior eficiência no uso de N para formação e enchimento dos grãos em comparação a variedade IAC-47. Embora a variedade tradicional tenha produzido a mesma quantidade de proteína bruta e frações protéicas que a variedade melhorada, apresentou maior produtividade, em condições de menor disponibilidade de nitrogênio.

Esses resultados indicam maior eficiência no uso de nitrogênio atribuída à variedade tradicional sob condições de baixa disponibilidade deste nutriente.

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.
- ARAÚJO, E. S. **Diversidade genética e acúmulo de proteína de reserva em arroz da baixada Maranhense-MA**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UFRuralRJ: Seropédica-RJ, 60p, 2002.
- ARAÚJO, E. S.; SOARES, A. P.; SOUZA, ANGELO, A. O.; S. R.; FERNANDES, M. S. Estudo das proteínas de reserva em variedades locais de arroz do Maranhão. In: II Congresso Brasileiro De Cadeia Produtiva Do Arroz, 2., 2006, Brasília. **Anais**. Santo Antônio de Goiás : Embrapa Arroz e Feijão, 2006. 1 CD-ROM ; 4 ¾ pol. – (Documentos / Embrapa Arroz e Feijão, ISSN 1678-9644 ; 196).
- ARAÚJO, E. S.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Características morfológicas e moleculares e acúmulo de proteína em grãos de variedades de arroz do Maranhão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.11, p.1281-1288, novembro de 2003.
- BARRIGOSI, J. A. F.; FERREIRA, E.; LANNA, A. C. **Panícula branca em arroz: o que causa?** Boletim Técnico. ISSN 1678-961X. Santo Antônio de Goiás, GO. Dezembro, 2004.
- BATISTA, K. **Respostas do capim-marandu a combinações de doses de nitrogênio e enxofre**. Tese de Mestrado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”: Piracicaba, Brasil, 2002.
- BORGES, E. A.; FERNANDES, M. S.; LOSS, A.; SILVA, E. E. da; SOUZA, S. R. Acúmulo e remobilização de nitrogênio em variedades de milho. **Revista Caatinga**, v.19, n.3. p.278-286, Mossoró, Brasil, 2006.
- BOUCHARD, D. C.; WILLIAMS, M. K.; SURAMPALLI, R. Y. Nitrate contamination of ground water: sources and potential health effects, **Journal of the American Water Works Association**, New York, v. 84, p. 85-90, 1992.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.
- BRESSANI, R.; ELIAS, L. G.; JULIANO, B. O. Evaluation of the protein quality and milled rices differing in protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, United States, v.19, n. 5, p.1028-1034, 1971.
- BRITTO, D. T.; GLASS, A. D. M.; KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y. Cytosolic concentration and transmembrane fluxes of NH₄⁺/NH₃. An evaluation of recent proposals. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p.523-526, 2001.
- BUCHER, C. A. **Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzima de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). UFRuralRJ: Seropédica-RJ, 50p, 2007.

- BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Effects of Fusicoccin and Vanadate on proton extrusion and potassium uptake by rice. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.29, p.485-496, 2006.
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L. E. & YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, US, v.6, p.853-855, 1975.
- DECKARD, E. L.; TSAI, C. Y.; TUCKER, T. C. Effect of nitrogen nutrition on quality of agronomic crops. In: R. D. Houck et al. (ed) Nitrogen in Crop Production. **American Soc. of Agronomy**, Wisconsin, p.601-615, 1984.
- EPSTEIN, M. & BLOOM, A. Nutrição Mineral de Plantas: Princípios e Perspectivas. Editora Planta, 2ª ed., 403p, 2006.
- FAÇANHA, A. R.; & MEIS, L. de. Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in Tonoplast Vesicles from Maize Coleoptiles and Seeds. **Plant Physiology**, v.116, p.1487-1495, 1998.
- FAO. **FAOSTAT**. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2006.
- FARNDEN, K. J. S.; ROBERTSON, J. G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen. In: BERGSEN, F. J. Ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, 1980.
- FARSUL. **Federação da Agricultura do Estado do RS**. Disponível em: <http://www.farsul.org.br/resources/anexos/comissao/CrescimentoeDesenvolvimento.doc> Acesso em: 22 de julho de 2007.
- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, 1977.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on the free-amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, Costa Rica, v.33, n.3, p.297-301, 1983.
- FERNANDES, M. S. N-carriers, light and temperature influences on uptake and assimilation of nitrogen by rice seeding. **Turrialba**, Costa Rica, v.34, p.9-18, 1984.
- FERNANDES, M. S.; & ROSSIELLO, R. O. P. Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.14, n.2, p.111-148, 1995.
- FERNANDES, M. S. & SOUZA, S. R. Absorção de Nutrientes. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 432p., Viçosa, 2006.
- FERRAZ JUNIOR, A. S. Estudo do teor de proteína e eficiência de uso de N em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.). Dissertação de Mestrado. UFRuralRJ. Seropédica-RJ, 186p., 1993.
- FERRAZ JUNIOR, A.S. L.; SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. Crude Protein in Rice Grown Different Environment Conditions. **Physiology Molecular Biology Plants**, Rohtak, v.7, n.2, p.149-157, 2001.
- FINBOW, M. E. & HARRISON, M. A. The vacuolar H⁺-ATPase: A universal proton pump of eukaryotes. **Biochemical Journal**, v.324, p.697-712, 1997.
- FONSECA, J.R.; RANGEL, P. H.; BEDENDO, L.; SILVEIRA, P. M.; GUIMARÃES, E. P.; CORANDIN, L. Características botânicas e agrônômicas de cultivares e raças regionais de arroz (*Oryza sativa* L.) coletadas no Estado do Maranhão. Goiânia. **EMBRAPA-CNPAF/EMBRAPA-CENARGEM**, Boletim de pesquisa, n.1, 42p, 1982.

- FONSECA, J.R.; RANGEL, P. H.; PRABHER, A. S. Características botânicas e agronômicas de cultivares e raças regionais de arroz (*Oryza sativa* L.). Goiânia. **EMBRAPA-CNPAP (circular técnico)**. 32p., 1984.
- FORNASIERI FILHO, D. & FORNASIERI, J. L. **Manual da Cultura do Arroz**. Ed. Funep, 453p. Jaboticabal, 1993.
- FORNASIERI FILHO, D. & FORNASIERI, J. L. **Manual da Cultura do Arroz**. Ed. Funep, 589p., Jaboticabal, 2006.
- GAXIOLA, R. A.; FINK, G. R.; HIRSCHI, K. D. Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. **Plant Physiology**, v.129, p.967-973, 2002.
- GLASS, A. D. M.; SHAFF, J. E. & KOCHIAN, L. V. Studies of the uptake of nitrate in barley. 4.Electrophysiology. **Plant Physiology**, v.99, n.2, p.456-463, 1992.
- 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 systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, n.370, p.855-864, 2002.
- HALL, D. O. & RAO, K. K. Photosynthesis. Studies in biology. **Cambridge University Press**. Cambridge, 1994.
- HIREL, B. & GODAL, P. Glutamine synthetase in rice. A comparative study of the enzymes from roots and leaves. **Plant Physiology**, v.66, p.619-623, 1980.
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; SANDRINE, C.; RETAILLEAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiology**, v.125, p.1258-1270, 2001.
- HU-CHENG, Z.; TING, Z.; JIA, W.; BAO-SHU, X. : Effect of Ca-2+ on H+-ATPase activity of plasma membrane in wheat root. **Colloids and Surfaces B-biointerfaces**. V.28, n.2-3, p.147-152, 2003.
- JAWORSKI, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research. Communication**, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- JULIANO, B. O. Polysaccharides, proteins and lipids of rice. In: Juliano, B.O. (Ed) Rice: Chemistry and Technology. St. Paul, Minnesota. **American Assoc. of Cereal Chem.**, 59-175, 1985.
- KAISER, W. M. & HUBER, S. C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, v.52 (363), p.1981-1989, 2001.
- KAWASAKI-NISHI, S.; NISHI, T.; FORGAC, M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. **FEBS Letter**, Boston, MA, USA, v.545, p.73-85, 2003.
- KING, B.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. Studies of the uptake of nitrate in barley. Estimation of root cytoplasmic nitrate concentration using nitrate reductase activity: implications for nitrate influx. **Plant Physiology**, v.99, p.1582-1589, 1992.
- KRAMER, P. J. & BOYER, J. S. *Water relations of plants and soils*. Academic Press. San Diego, 1995.
- LÁSZTITY, R. The chemistry of cereal proteins. CRC. Press., Boca Raton, Florida, 203p. 1986.

- LOPES, A.S. **Manual internacional de fertilidade do solo**. Piracicaba: Potafos, 177p.,1998.
- MAESHIMA, M. Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. **Biochemica et Biophysica Acta**, Nagoya, Japan, v.1465, p.37-51, 2000.
- MAGALHÃES, J. R. & HUBER, D. M. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control in solution culture. **Fertility research**, v.21, p.1-6. 1989.
- MAJEROWICZ, N.; PEREIRA, J. M. S.; MÉDICI, L. O.; BIZON, O.; PEREIRA, M. B.; SANTOS JÚNIOR, U. M. Estudo da eficiência de uso do nitrogênio em variedades locais e melhoradas de milho. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 129-136, 2002.
- MANN, C. Reseeding the green revolution. **Science**, Madison, v. 277, p.1038-1043, 1997.
- MARSCHNER, H. Mineral nutrition of higher plants. **Academic Press**. San Diego, 1995.
- NALIVKO, G. V.; PETEOSKAYA, V. S.; DAZYUBA, O. M. Variability of protein and amino acid content in rice grain. **Applied Biochemistry and microbiology**, v.11, n.4, p.506-510, 1975.
- NORMAN, R. J.; GUINDO, G.; WELLS, B. R.; WILSON JR, C. E. Seasonal accumulation and partitioning of nitrogen-15 in rice. *Sci. Soc. & Am. Journal*, v. 56, p1521-1527, 1992.
- OAKS, A. Primary nitrogen assimilation in higher plants and its regulation. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.739-750, 1994 .
- PADMANABAN, S.; LIN, X.; PERERA, I.; KAWAMURA, Y.; SZE, H. Differential Expression of Vacuolar H⁺-ATPase Subunit c Genes in Tissues Active in Membrane Trafficking and Their Roles in Plant Growth as Revealed by RNAi. **Plant Physiology**, North Carolina State University, v.134, p.1514-1526, 2004.
- PATE, J. S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of plant Physiology**, v. 31, p.313-340, 1980.
- PATRICK, R. M. & HOSKINS, F. H. Protein and amino acid content of rice as affected by application of nitrogen fertilizer. **Cereal Chem.**, v.51, p.84-95, 1974.
- PEREZ, C. M.; CAGAMPANG, G. B.; MOSENATE, R. V.; JULIANO, B. O. Protein metabolism in leaves and developing grains of rices differing in grain protein content. *Plant Physiology*, v.51, p537-542, 1973.
- PEROZZI, M. Produtividade responde por 85% do crescimento da produção mundial de arroz. Website: Arroz Brasileiro. Disponível em: <<http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/050815.php>>. Acesso em: 5 de Dezembro de 2007.
- PIMENTEL, C. Metabolismo de carbono na agricultura tropical. Seropédica: Edur, 150p.,1998.
- PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S.; URENHA, L. C. Produção de inoculantes Agrícolas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 3. p. 279-305, 2001.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERTI, B.; BORSA, P.; DESTRO, T. & MALAGOLI, M. Expression of a putative high-affinity NO₃⁻ transporter and of an H⁺-ATPase in relation to whole plant nitrate transport physiology in two maize genotypes differently responsive to low nitrogen availability. **Journal of Experimental Botany**, v.54, n.384, p.1023-1031, 2003.

- RATAJCZAK, R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. **Biochemical and Biophysical Acta**, v. 1465, p.17-36, 2000.
- RAUN, W. R.; JOHNSON, G. V. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. **Agronomy Journal**, Madison, v. 91, n. 3, p. 357- 363, 1999.
- RAUN, W. R.; SOLIER, J. B.; JOHNSON, G. V.; STONE, M. L.; MULLEN, R. W.; FREEMAN, K. W.; THOMASON, W. E.; LUKINA, E. V. Improving nitrogen use efficiency in cereal grain production with optical sensing and variable rate application. **Agronomy Journal**, Madison, v. 94, p. 815-820, 2002.
- RICHTER, G. *Métabolisme des végétaux. Physiologie et biochimie.* (Trad. de RAYMOND, G.). Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne, 1993.
- RODRIGUES, F. S. Metabolismo de nitrogênio em arroz cultivado sob fluxo sazonal de nitrato. **Tese de Mestrado** – UFRuralRJ, Seropédica, RJ, 119 p., 2001.
- RODRIGUES, F. S.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogen Metabolism in Rice Cultivated under Seasonal Flush of Nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, v.27, n.3, p.395-409, 2004.
- SABINO, D. C. C. Metabolismo de nitrogênio em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) em associação com bactérias diatópicas endofíticas. Dissertação de Mestrado. UFRuralRJ, Seropédica-RJ, 2003.
- SANTI, S.; LOCCI, G.; PINTON, R.; CESCO, S.; VARANINI, Z. Plasma Membrane H⁺-ATPase in Maize Roots Induced for NO₃⁻ Uptake. **Plant Physiology**, v.109, p.1277-1283, 1995.
- SANTOS, A. M. STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Effects of seasonal nitrate flush on nitrogen metabolism and soluble fractions accumulation in two rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, v.30, p.1371-1384, 2007.
- SANTOS, A. M. Absorção, assimilação e remobilização de nitrogênio em arroz, sob nutrição nítrica. Avaliação da expressão gênica diferencial. **Tese de Doutorado**, UFRuralRJ: Seropédica, Brasil, 2006b.
- SANTOS, L. A. Absorção e remobilização de NO₃⁻ em arroz (*Oryza sativa* L.): Atividade das bombas de prótons e a dinâmica do processo. **Tese de Mestrado**, UFRuralRJ: Seropédica, Brasil, 2006a.
- SHERRAD, J. H.; LAMBERT, R. J.; MESSMER, M. J.; BELOW, F. E.; HAGEMAN, R. H. Plant breeding of efficient plant use of nitrogen. In: HAUCK, R. D. (Ed.) Nitrogen in crop production. ASA, CSSA, SSSA, Madson, Winconsin, USA, 1984.
- SMITH, C. J.; FRENEY, J. R.; CHAPMAN, S. L.; GALBALLY, I. E. Fate of urea nitrogen applied to irrigated wheat at heading. **Aust. J. Agric. Research.**, v. 40, p.951-963, 1989.
- SONDERGAARD, T. E.; SCHULZ, A.; PALMGREN, M. G. Energization of Transport Processes in Plants. Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v.136, p.2475-2482, 2004.
- SOUZA, S. R. Efeitos da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteína em grãos de arroz. **Tese de Doutorado**, UFRRJ: Seropédica, Brasil, 1995.
- SOUZA, S.R. Teor e qualidade das proteínas do arroz com aplicação foliar e no solo de URAN. Instituto de Agronomia. *Dissertação*, 98p., UFRRJ. 1990.

- SOUZA, S. R. & FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M. S. Nutrição Mineral de Plantas. Ed. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 432p., Viçosa, 2006.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. Effects of supplemental-nitrogen on the quality of rice proteins. **Journal of Plant Nutrition**, n. 16, v. 9, p.1739-1751, 1993.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, n. 21, p. 10, p.2049-2063, 1998.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M. S.; MAGALHÃES, J. R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen-assimilation enzymes, Free amino nitrogen, soluble sugars, and crude protein of rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Boca Raton, v.30, n. 5/6, p. 711-724, 1999.
- TECSON, E. M.; ESMANA, B. V.; LONTOK, L. P.; JULIANO, B. O. Studies on the extraction and composition of rice endosperm glutelina and prolamina. **Cereal Chemistry**, v.48, p.168-181, 1971.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solo, palntas e outros materiais. Porto Alegre: Departamento de solos, UFRRJ, 1995.
- TISCHNER, R. Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant Cell and Environment**, v.23, p.1005-1024, 2000.
- TRAORE, A.; MARANVILLE, J. W. Nitrate reductase activity of diverse grain sorghum genotype and its relationship to nitrogen use efficiency. **Agronomy Journal**, Madison, v. 91, p. 863-869, 1999.
- TURLEY, R. H; CHING, T. M. Storage protein accumulation in Scio Barley Seed as affected by late foliar application of nitrogen. **Crop Science**, v.26, p.778-782, 1986.
- VAN LOON, G. W.; DUFFY, S. J. Microbiological processes. In: ENVIRONMENTAL Chemistry. New York: Oxford University, 2001. Cap. 15. p. 492.
- WADA, G.; SHOJI, S.; MAE, T. Relationship between nitrogen absorption and growth and yield of rice plants. **J. A. R. Q.**, v.20, n.2, p.135-145, 1986.
- WILLIAMS, L. E. & MILLER, A. J. Transporters Responsible for the Uptake and Partitioning of Nitrogenous solutes. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.52, p.659-688, 2001.
- WANDER, A. E. As exportações brasileiras de arroz: motivo de comemoração ou de preocupação? In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CADEIA PRODUTIVA DO ARROZ, 2.; REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE ARROZ , 8.; 2006, Brasília, DF. **Anais...** 1 CD-ROM. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 196). Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2006.
- YANEVA, I. A.; BAYDANOVA, V. D.; VUNKOVA-RADEVA, R. V. Nitrate reductase activation state in leaves of molybdenum-deficient winter wheat. **Journal of Plant Physiology**, v.157, p.495-501, 2000.
- 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.