

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

TESE

Caracterização Genética de Arroz
(*Oryza sativa L.*) Através de Marcadores
Moleculares RAPD e
Eficiência na Aquisição de N

Jane de Araújo Baptista

2002



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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ARROZ
(*Oryza sativa* L.) ATRAVÉS DE MARCADORES MOLECULARES
RAPD E EFICIÊNCIA NA AQUISIÇÃO DE N**

JANE DE ARAÚJO BAPTISTA

Sob a Orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação das Profs
Sonia Regina de Souza

Norma Gouvea Rumjanek

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau de
Philosophiae Doctor em
Agronomia, Área de Concentração
em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Março de 2002

581.15
B222c
T

Baptista, Jane de Araújo, 1966-
Caracterização genética de arroz
(Oryza Sativa L.) através de marcadores
moleculares RAPD e eficiência na
aquisição de N. / Jane de Araújo
Baptista. - 2002.
155 f. : il.

Orientador: Manlio Silvestre
Fernandes.

Tese(doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Instituto de Agronomia.

Bibliografia: f. 138-148.

1. Genética vegetal - Teses. 2. Arroz
- Genética - Teses. 3. Arroz -
Melhoramento genético - Teses. 4.
Marcadores biológicos - Teses. 5.
Plantas - Efeito do nitrogênio - Teses.
I. Fernandes, Manlio Silvestre, 1939-.
II. Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Agronomia. III.
Título.

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

JANE DE ARAÚJO BAPTISTA

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo, como requisito parcial para obtenção do grau de *Philosophiae Doctor*, em Agronomia.

TESE APROVADA EM 27/03/2002.

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

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

Norma Gouvêa Rumjanek PhD. EMBRAPA-CNPAB
(Co-orientador)

Hugo Alberto Ruiz Dr. UFV

José Ronaldo Magalhães Dr. EMBRAPA-CNPGL

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ser Mestre
É mais que ter um título,
É mais que deter conhecimento,
É mais que ser professor.
Ser Mestre
É ter capacidade de iniciar
no caminho do Saber qualquer sonhador.
E com a humildade de só quem detém
o Saber Magistral,
mostrar com exemplos,
que o conhecimento é o estudo constante,
a pesquisa incessante
atrás do Saber.

Agradeço ao meu **Grande e Querido Mestre,**
Manlio Silvestre Fernandes, que me iniciou no
caminho da ciência, e, principalmente, por me fazer
compreender, que não se pode deter o Saber, pois,
ele está um passo sempre a nossa frente.

Ser Mestre, é ser AMIGO.
E isso MESTRE tu és
Obrigado por tudo.
Jane.

A Deus, por seu Amor, Benevolência, Justiça, Compreensão, por ser o arrimo de minha sorte e o meu Pastor em todos os dias de minha existência;

Aos meus queridos e amados Pais por manter a minha mente e alma abertas com o seu amor, carinho e dedicação;

Aos meus irmãos e sobrinha, pelo amor, amizade, paciência e confiança que me dedicam e por terem me ensinado a expressão máxima da palavra família;

Aos meus tios e primos pela amizade e amor;

Aos ideais e sonhos que forneceram os fios resistentes e coloridos com os quais eu tecei minha definição particular do significado da vida,

Dedico Apaixonadamente e com Amor

AGRADECIMENTOS

A UFRRJ pela oportunidade de realização do curso;

À professora Sonia Regina de Souza pela orientação do trabalho de Tese e pelo estímulo dado e amizade em todos os momentos;

Às amigas Mariam Lis Stark, Rosa Maria Barbosa, Ana Cristina Portugal, Sandra Barros Sanches, Cíntia Toledo Machado, Eliane de Almeida e Sonia Regina de Souza por mostrarem que a amizade e carinho é a força que dá direção a nossas vidas;

Ao amigo Marco Gervasio Pereira pelo carinho e amizade eterna que se consolidou entre nós;

À pesquisadora Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação, sem a qual este trabalho não teria sido realizado;

Ao professor Hugo Alberto Ruiz (UFV) pelo programa "Cinética de absorção";

Ao meu amigo Gustavo Xavier/EMBRAPA por ter fornecido os reagentes mais importantes para as minhas análises: estímulo, amizade e uma dedicação à pesquisa contagiante ;

Aos estudantes Paulo Roberto S. Andrade, Leandro Glaydson, Carlos Alberto Bucher, Aline Heiderich e Mateus pela amizade e pela colaboração nos trabalhos de laboratórios;

Aos professores Lúcia Helena Cunha dos Anjos, Nelson Mazur, Gabriel Araujo dos Santos, Alexandre Raveli, Marcos Bacis, pelo estímulo, amizade e incentivo que me deram sempre;

Ao secretário da Pós-Graduação Nilson Brito de Carvalho pelas constantes brincadeiras que tornaram o meu o convívio no departamento de Solos muito agradável, e por sua amizade;

Aos funcionários Jorge, Tadeu, Maria Helena, Irani, Denise, Manoel, Pedro, Cida, Luciene (Depto. de Solos), Conceição, Renato e Rui (Depto. de Química) pela amizade e colaboração nos trabalhos de Tese;

Aos amigos e colegas Cláudia, Fabíola, Mônica, Enderson Jerri, Lindete, Nilton, Elisângela, Conceição, Fabiana, Carolina, Érica pela amizade e pelos momentos alegres em que sempre permanecemos juntos;

Aos demais Professores e colegas do Departamento de Solos pela ajuda e apoio prestados.

Ao EMBRAPA Arroz e Feijão, pelas sementes e pelas informações técnica sobre as variedades de arroz;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES- pela bolsa de pesquisa.

E a todos aqueles que incentivaram a realização de um sonho e que me ajudaram a perceber que sempre vale a pena lutar pelo que se deseja.

*"Fraco é aquele que permite que seus pensamentos controlem suas ações;
Forte é aquele que força suas ações a controlar seu pensamento. O fracasso jamais
surpreenderá alguém cuja decisão de vencer for suficientemente forte."
(Og Mandino)*

*"A melhor qualidade de um pesquisador é a imaginação".
Albert Einstein*

*"A sorte favorece a mente preparada."
Luiz Pasteur*

BIOGRAFIA

Jane de Araújo Baptista, filha de Jerônimo Baptista e Vanderli de Araújo Baptista, nascida em 08 de junho de 1966, na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Realizou o curso Técnico em Agropecuária no Colégio Técnico da UFRRJ e diplomou-se em Engenharia Agrônômica pela mesma instituição, em novembro de 1991.

Foi durante sua graduação, Bolsista de Iniciação Científica do CNPq de agosto de 1989 a agosto de 1990, junto ao Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do Departamento de Solos da UFRRJ e monitora da disciplina Propagação de Plantas junto ao Departamento de Fitotecnia da UFRRJ no período de agosto de 1990 a outubro de 1991. É Mestre em Agronomia, área de concentração em Ciência do Solo, pós-graduada em 1995 pela UFRRJ. Em março de 1998 ingressou no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, nível de Doutorado, na de Área de concentração em Ciência do Solo na UFRRJ.

Atuou no cargo de Engenheira Agrônoma da Escola Agrotécnica de Colatina – ES, durante o período de janeiro a abril 1995. Atualmente, é Controladora de Recursos Públicos na área de Agronomia do Tribunal de Contas do Estado do Espírito Santo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2. CAPÍTULO I – CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VARIEDADES DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.) USANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD	3
2.1 RESUMO	4
2.2 ABSTRACT	4
2.3 INTRODUÇÃO	5
2.4 REVISÃO DE LITERATURA	7
2.4.1 O Material Genético	7
2.4.2 Métodos Moleculares	7
2.4.3 Evolução dos Descritores	8
2.4.4 Marcadores Moleculares	9
2.4.5 Marcadores Moleculares Baseados em Hibridização	9
2.4.6 RFLP	9
2.4.7 Microssatélites ou VNRT	10
2.4.8 Marcadores Moleculares Baseados em PCR	11
2.4.9 RAPD	12
2.4.10 SCAR (Seqüência Caracterizada por Regiões Amplificadas)	14
2.4.11 STS (Seqüência repetida específica) ou ASA (Amplificação Específica do Fragmento)	15
2.4.12 SSR (Seqüência Simples Repetida) ou Microssatélites	15
2.4.13 AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)	16
2.4.14 SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)	16
2.4.15 Aspectos Relevantes na Escolha da Técnica Molecular	17
2.4.16 Análise de Agrupamentos	18
2.4.17 Coeficientes de Similaridades	20
2.5 MATERIAL E MÉTODOS	21
2.5.1 Material Vegetal	21
2.5.2 Otimização das Condições de Reação para Extração de DNA	22
2.5.3 Protocolo Utilizado Após Otimização de Extração de DNA Total	23
2.5.4 Quantificação do DNA Extraído	23
2.5.5 Otimização do Ensaio RAPD	24
2.5.6 Ensaio RAPD	24
2.5.7 Análises dos Dados	25
2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
2.6.1. Otimização das Condições de Reação para Extração de DNA	26
2.6.2 Otimização da Amplificação de DNA Amostrado de 16 Variedades de Arroz. ...	27
2.6.3 Polimorfismo	29
2.6.4 Comparação de Dendrogramas	34
2.6.5 Correlações entre os Coeficientes	39
2.7 CONCLUSÕES	40

3. CAPITULO II – EFICIÊNCIA DE ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO EM ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.)	41
3.1 RESUMO.....	42
3.2 ABSTRACT	42
3.3 INTRODUÇÃO	43
3.4 REVISÃO DE LITERATURA.....	44
3.4.1 Cultura do Arroz de Sequeiro.....	44
3.4.2 O Genoma do Arroz e o Melhoramento Genético.....	45
3.4.3-Nitrogênio	46
3.4.4 Absorção de NH_4^+ pelas Plantas.....	47
3.4.5 Transportadores de NH_4^+	48
3.4.6 H^+ -ATPases e a Absorção de N.....	49
3.4.7 Assimilação do Nitrogênio	50
3.5 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.5.1 Localização e Condicionantes Ambientais.....	53
3.5.2 Obtenção do Material Vegetal.....	53
3.5.3 Cinética de Absorção de Nitrogênio.....	54
3.5.4 Extrusão de Prótons.....	55
3.5.5 Enzimas do Metabolismo de N.....	55
3.5.6 Partição de N.	56
3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
3.6.1 Experimento 1: Efeito da Concentração e Forma de N Sobre a Extrusão de Prótons e Parâmetros Cinéticos de Absorção	57
3.6.2 Cinética de Absorção de N	60
3.6.3 Partição de N em Plantas.....	68
3.6.4 Experimento 2: Efeito da Concentração e Forma de N Sobre a Eficiência na Absorção e Assimilação de Nitrogênio.	71
3.6.5 Partição de N em plantas	73
3.6.6 Metabolismo de N	75
3.7 CONCLUSÕES.....	84
4. CAPITULO III – EFEITO DO FLUXO SAZONAL DE NITRATO SOB O METABOLISMO DE N EM PLANTAS DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.)	85
4.1 RESUMO.....	86
4.2 ABSTRACT	87
4.3 INTRODUÇÃO	88
4.4 REVISÃO DE LITERATURA.....	89
4.4.1 Absorção de NO_3^- pelas Plantas	89
4.4.2 Sistemas de Transporte de NO_3^- em Plantas.....	91
4.4.3 Transportadores de NO_3^-	91
4.4.4 Regulação da Absorção de Nitrato	93

4.5 MATERIAL E MÉTODOS	96
4.5.1 Localização e Condicionantes Ambientais	96
4.5.2 Obtenção do Material Vegetal	96
4.5.3 Enzimas do Metabolismo de N	97
4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4.6.1 Partição de N em Plantas	99
4.6.2 N-NO ₃ nos Tecidos Vegetais	99
4.6.3 N- NH ₄ ⁺ nos Tecidos Vegetais	101
4.6.4 Amino-N nos Tecidos Vegetais	104
4.6.5 Açúcares Solúveis nos Tecidos Vegetais	105
4.6.6 N-Total dos Tecidos Vegetais	109
4.6.7 Dados Morfológicos	110
4.6.8 Atividade de NR	112
4.6.9 Efeito da Concentração de NO ₃ Sob a Atividade de NR	114
4.6.10 Atividade de GS	117
4.6.11 Atividade de GOGAT	121
4.6.12 Atividade de GDH-A	124
4.6.13 Atividade de GDH-D	126
4.7 CONCLUSÕES	131
5. CONCLUSÕES GERAIS	132
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
7. ANEXOS	144
7.1 ANEXO I	144
7.1.1 Preparo de Soluções Utilizadas nos Protocolos	144
7.2 ANEXO II	146
7.2.1 Coeficientes de Similaridades Obtidos Para as 17 Variedades de Arroz:	146
7.3 ANEXO III	148
7.3.1 Médias de Temperaturas Máximas e Mínimas Medidas Durante a Condução dos Experimentos	148

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Variedades de arroz que foram utilizadas no experimento e suas características fenotípicas.	21
Tabela 2. Bandas apresentadas pelo marcador de DNA fago Lambda /HIND III	24
Tabela 3. Coeficientes de similaridade estudados.	25
Tabela 4. Códigos e seqüências dos Iniciadores usados e número de fragmentos amplificados de 16 variedades de arroz.	29
Tabela 5. Número médio de bandas polimórficas por iniciador entre grupos de variedades de arroz.	33
Tabela 6. Local de coleta das variedades locais utilizadas no experimento.	38
Tabela 7. Matriz de similaridade genética referentes coeficientes a correlações de Spearman.	39

Capítulo II

Tabela 1. Relação das cultivares de arroz recomendadas para o cultivo nos sistemas de sequeiro no Brasil para safra 1997/1998.	45
Tabela 2. Fonte e concentração dos nutrientes componentes da solução nutritiva de crescimento.	54
Tabela 3: Peso fresco e seco de folhas, caule e raízes de plantas de arroz, aos 42 DAG (médias de três repetições).	57
Tabela 4. Extrusão de prótons (neq/g.pf.raiz.h) por raízes de arroz com 42 dias de idade submetidas à duas doses N-NO ₃ ⁻ em solução nutritiva.	60
Tabela 5: Valores médios de V _{máx} , K _M determinados em plantas de arroz aos 42 DAG, submetidas a solução nutritiva com N na forma amoniacal.	64
Tabela 6: Peso fresco e seco de folhas, caule e raízes de plantas de arroz, aos 42 DAG (média de 3 repetições).	72
Tabela 7. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 60 mg N/L) (1º experimento: Cinética de absorção).	81
Tabela 8. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 60 mg N/L). (1º experimento: Cinética de absorção).	82
Tabela 9. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 60 mg N/L)	83

Capítulo III

Tabela 1. Teores de N-total, em folhas, caule e raízes de arroz submetidas a aplicação de 20 e 200 mg N/L, simulando o fluxo sazonal de nitrato.....	110
Tabela 2: Peso fresco de folhas, caule e raízes de arroz submetidas a simulação de fluxo sazonal de nitrato.....	111
Tabela 3: Peso Seco de folhas, caule, raízes e relação raiz:parte aérea em plantas de arroz submetidas a simulação de fluxo sazonal de nitrato.....	112
Tabela 4. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L.	129
Tabela 5. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L.	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. 1- Extração de DNA utilizando marcador Lambda1 amplificação randômica de DNA usando iniciador OPE – 19 (5'ACGGCGTATG3') de variedades de arroz : (A) Amostras de 20 mg de tecido de folha (B) amostras de 30 mg de tecido de folha : 1, 11- marcador ø 174; 2, 12- Lageado; 3, 13- Bico Ganga, 4,14- Zebu Branco; 5,15- Ligeiro Vermelho; 6,16- Goiano; 7,17- Comum Branco; 8,18- Dobradinho; 9,19-Arroz de Revenda; 10,20- Cana Roxa.	26
Figura 2. DNA extraído de variedades de arroz após otimização dos procedimentos de extração de DNA.	27
Figura 3. Efeito da concentração de DNA extraído de 03 variedades de arroz sobre a amplificação randômica de DNA usando iniciador OPE – 06 (5'AAGACCCCTC3'). Todas as reações foram conduzidas na temperatura de anelamento de 35°C por 1 minuto, com idêntica concentrações de iniciador (0.4 µM), magnésio (2.2mM) e Taq polimerase (1 unidade). Foram testadas duas concentrações de DNA, 5 ng (2,3,4) e 10 ng (5,6,7).	28
Figura 4. Efeito da concentração de Iniciador (OPE-18 5'GGACTGCAGA3'). Todas as reações foram conduzidas na temperatura de anelamento de 35°C por 1 minuto, com idêntica concentrações de DNA (5 ng), magnésio (2.2mM) e Taq polimerase (1 unidade). Foram testadas duas concentrações de iniciador, 0.4 µM (2,3,4) e 0.2 µM (6,7,8).	28
Figura 5. Amplificação randômica de DNA usando iniciador OPE – 19 (5'ACGGCGTATG3') de variedades de arroz: 1,11- marcador ø 174; 2- Lageado; 3- Bico Ganga, 4, Zebu Branco; 5- Ligeiro Vermelho; 6- Goiano; 7- Comum Branco; 8- Dobradinho; 9-Arroz de Revenda; 10- Cana Roxa; 11- Ligeiro, 12- Sagrimão; 13- Agulha; 14- IAC-47; 15- IAC25; 16- IAC1278; 17,18-IR-07; 19 - Vazio; 20- marcador Lambda.	30
Quadro 1. Matriz gerada por ausência (0) e presença (1) de bandas geradas por 15 iniciadores de seqüência arbitrária aplicados no método RAPD para variedades de arroz.	31
Quadro 2. Matriz gerada por ausência (0) e presença (1) de bandas geradas por 15 iniciadores de seqüência arbitrária aplicados no método RAPD para variedades de arroz (continuação).	32
Quadro 3. Matriz gerada por ausência (0) e presença (1) de bandas geradas por 15 iniciadores de seqüência arbitrária aplicados no método RAPD para variedades de arroz (continuação).	33
Figura 6. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Nei & Li, que não considera ausência da banda como similaridade.	35
Figura 7. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard, que não considera ausência da banda como similaridade.	35
Figura 8. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Ochiai, que não considera ausência da banda como similaridade.	35
Figura 9. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Simple Matching, que considera ausência da banda como similaridade...	36
Figura 10. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Rogers & Tanimoto, que considera ausência da banda como similaridade	36

Capítulo II

Figura 1. Mecanismos de transporte (ativo e passivo) de íons através da membrana plasmática.....	49
Figura 2A e 2B. Efeito da concentração de NH_4^+ (20 e 60 mgN) sob a variação do pH da solução nutritiva, em plantas de arroz com 42 DAG.....	58
Figura 3A e 3B. Efeito da concentração de NO_3^- (20 e 60 mgN) sob a variação do pH da solução nutritiva, em plantas de arroz com 42 DAG.....	59
Figura 4. Curva de absorção de N-NH_4^+ na solução nutritiva em função do tempo de exposição das plantas ao meio com 20 mgN/L.....	61
Figura 5. Curva de absorção de N-NH_4^+ na solução nutritiva em função do tempo de exposição de plantas de arroz ao meio com 60 mgN/L.....	62
Figura 6. Curva de absorção de N-NO_3^- na solução nutritiva em função do tempo de exposição de plantas de arroz ao meio com 20 mgN/L.....	63
Figura 7. Curva de absorção de N-NO_3^- na solução nutritiva em função do tempo de exposição de plantas de arroz ao meio com 60 mgN/L.....	63
Figura 8. Influxo de NH_4^+ e extrusão de H^+ por plantas de arroz, com 42 DAG, submetidas a duas doses 20 e 60mg de N-amoniacal.....	67
Figura 9. Influxo de NO_3^- e extrusão de H^+ por plantas de arroz, com 42 DAG, submetidas a duas doses 20 e 60mg de N-amoniacal.....	67
Figura 10. Concentração de NH_4^+ em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.....	68
Figura 11. Concentração de NO_3^- em folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.....	69
Figura 12. Concentração de amino-N em Folhas de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.....	70
Figura 13. Concentração de açúcares solúveis em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mg N/L.....	71
Figura 14: Raízes das variedades Agulha, Lageado, Bico Ganga e IAC 47, aos 5 dias após a germinação.....	72
Figura 15. Concentração de NH_4^+ em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.....	73
Figura 16. Concentração de NO_3^- em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.....	74
Figura 17. Concentração de amino-N em Folhas de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.....	74
Figura 18. Concentração de açúcares solúveis em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.....	75
Figura 19. Atividade de NR em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.....	76
Figura 20. Atividade de GS em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.....	77
Figura 21. Atividade de GOGAT em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.....	79
Figura 22. Atividade de GDH-Aminação em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.....	80
Figura 23. Atividade de GDH-Deaminação em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.....	81

Capítulo III

- Figura 1.** Esquema dos processos de redução e assimilação de nitrato: no citoplasma, NO_3^- é reduzida a NO_2^- pela nitrato redutase (NR – EC.1661); a reação usa o agente redutor NADH (mitocôndria); NO_2^- migra para o cloroplasto (folha) ou para os plastídeos (raiz) onde a redução a NH_4^+ é mediada pela nitrito redutase (NiR). Os seis (6) elétrons são doados para esta reação pela ferredoxina, um dos componentes da cadeia de transportadores de elétrons do fotossistema I; No cloroplasto, NH_4^+ é incorporado em um composto orgânico com 5-C, formando glutamato. O Glutamato pode sofrer uma amidação (adição de outra molécula de NH_4^+) formando glutamina.. 89
- Figura 2.** As três classes gerais de sistemas de transporte..... 92
- Figura 3.** Esquema experimental da Simulação do fornecimento sazonal de nitrato em plantas sob cultivo em solução nutritiva. (A) com aplicação de 200 mg N- NO_3^- de maneira a criar a sazonalidade existente em determinados ambiente dos trópicos úmidos e (B) com fornecimento contínuo de 20 mg N- NO_3^- durante todo o período experimental. 97
- Figura 4.** Concentração de NO_3^- em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (62 dias após a emergência). 100
- Figura 5.** Concentração de NO_3^- em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (69 dias após a emergência). 102
- Figura 6.** Concentração de NH_4^+ em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (62 dias após a emergência). 103
- Figura 7.** Concentração de NH_4^+ em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (69 dias após a emergência). 104
- Figura 8.** Concentração de amino-N em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (62 dias após a emergência). 106
- Figura 9.** Concentração de amino-N em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (69 dias após a emergência). 107
- Figura 10.** Concentração de açúcares solúveis em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (62 dias após a emergência). 108
- Figura 11.** Concentração de açúcares solúveis em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (69 dias após a emergência). 109
- Figura 12.** Atividade de Nitrato Redutase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta

feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (62 dias após a emergência)	113
Figura 13. Atividade de Nitrato Redutase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (69 dias após a emergência).	115
Figura 14. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de NR em folhas e raízes de plantas de arroz, sob duas doses de NO ₃ ⁻ , 20 e 200 /L, dois dias após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L.	116
Figura 15. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de NR em folhas e raízes de plantas de arroz, sob duas doses de N 20 e 200 mg/L, nove dias após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200 mgN/L.....	116
Figura 16. Atividade de Glutamina Sintetase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (62 dias após a emergência)	118
Figura 17. Atividade de Glutamina sintetase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (69 dias após a emergência).....	119
Figura 18. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de GS em folhas e raízes de plantas de arroz, dois após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200mg NO ₃ ⁻ /L (62 dias após a emergência).....	120
Figura 19. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de GS em folhas e raízes de plantas de arroz, nove dias após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200mg NO ₃ ⁻ /L (69 dias após a emergência).....	121
Figura 20. Atividade de Glutamato Sintase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (62 dias após a emergência)	122
Figura 21. Atividade de Glutamato Sintase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (69 dias após a emergência)	123
Figura 22. Atividade de GDH-Aminação em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (62 dias após a emergência)	125
Figura 23. Atividade de GDH-Aminação em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (69 dias após a emergência)	126
Figura 24. Atividade de GDH-Deaminação em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (62 dias após a emergência)	127
Figura 25. Atividade de GDH-Deaminação em (A) folhas de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO ₃ ⁻ /L (69 dias após a emergência).....	128

RESUMO GERAL

BAPTISTA, Jane de Araújo. **Caracterização Genética de Arroz (*Oryza sativa* L.) Através de Marcadores Moleculares RAPD e Eficiência na Aquisição de N.** Seropédica: UFRRJ, 2002. 148p. (Tese, Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo).

Neste trabalho avaliaram-se as alterações provocadas por 6 diferentes coeficientes de similaridade no agrupamento de 16 variedades de arroz analisadas pela técnica de RAPD. Amostras de DNA das variedades foram amplificadas com 20 iniciadores, sendo 15 (75%) produziram fragmentos amplificados, resultando em 90 fragmentos polimórficos. A análise dos resultados se constituiu na descrição do padrão de bandas. Para o cálculo do coeficiente de similaridade foram testados os coeficientes Nei & Li, Jaccard, Ochiai, Russel & Rao, Simple Matching e Rogers & Tanimoto, sendo as comparações entre eles realizadas pela avaliação dos dendrogramas gerados pelo algoritmo UPGMA e pelas correlações entre as distâncias genéticas. Os resultados obtidos indicam que os melhores coeficientes para determinação da similaridade foram os de Nei & Li, de Jaccard e de Ochiai que foram capazes de agrupar as variedades com alta similaridade, enquanto os coeficientes Simple Matching e de Rogers & Tanimoto foram ligeiramente inferiores colocando variedades distantes no mesmo grupo. Em experimentos objetivando analisar o efeito de níveis (20 e 60 mg N/L) e formas de N (NH_4^+ e NO_3^-) sob os parâmetros cinéticos de absorção, a extrusão de prótons, a atividade das enzimas de assimilação de N, e a partição de N na planta, usou-se 5 variedades de arroz-de-sequeiro (Lageado, IAC 47, Dobradinho, Agulha e Bico Ganga), cultivadas em solução nutritiva. Houve um comportamento diferencial entre as variedades quanta à capacidade de absorção e uso de N. As variedades Agulha e IAC 47 apresentaram a melhor combinação de K_M , $V_{\text{máx}}$, GS/GOGAT em condições de alta disponibilidade de N-NO_3^- , e a variedade Bico Ganga, sob condições de baixa disponibilidade de N. Noutro experimento, objetivando estudar a assimilação e remobilização de N em condições sazonais de N, utilizou-se as variedades Sagrimão, Goiano, Zebu, Agulha, IAC 1278, IR 08, Comum Branco, IAC 25 e Ligeiro, com 62 e 69 dias de idade, cultivadas em solução nutritiva, com 20 e 200 mg $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$. O aumento no suprimento de N aumentou a atividade da NR, da GS e GOGAT. A atividade de NR ocorreu em raízes e na parte aérea. A atividade da GS foi baixa em raízes. A atividade da GOGAT foi maior nas raízes, em ambos os tratamentos. A atividade de GDH-A ocorreu principalmente em tecidos foliares. A atividade de GDH-D ocorreu tanto em folhas como em raízes. A atividade das enzimas de assimilação de N foi superior nas folhas, indicando serem estas os principais sítios de incorporação de amônio em aminoácidos, quando plantas de arroz são submetidas a altos níveis de NO_3^- .

Palavras-chave: Similaridade genética, cinética de absorção, assimilação de N

GENERAL ABSTRACT

BAPTISTA, Jane de Araújo. **Genetic Characterization of Rice (*Oryza sativa* L.) Using the RAPD Molecular Markers and Nitrogen Uptake Efficiency.** Seropédica: UFRRJ, 2002. 148p. (Thesis, Doctor Science, Agronomy, Soil Science).

We have studied the influence of using 6 different coefficients of similarity when grouping 16 varieties of rice analyzed by the RAPD technique. DNA samples of these varieties were amplified using 20 primers, only 15 (75%) of which produced amplified fragments, comprising 90 of these were polymorphic fragments. The analysis of the band profile produced a "fingerprint". For the calculation of the similarity index several coefficients were tested: Nei & Li, Jaccard, Ochiai, Russel & Rao, Simple Matching and Rogers & Tanimoto. Comparison among them was carried out through the evaluation of the dendrograms generated by the UPGMA algorithm and by the correlations between the genetic pitches. The coefficients of Nei & Li, Jaccard, and Ochiai discriminated the varieties in three main groups according to their genetic similarities. Our results show that the coefficients of Nei & Li, Jaccard and Ochiai adjusted better the groups with high genetic similarities. While the coefficients Simple Matching and Rogers & Tanimoto were not as efficient, banding together varieties that are genetically different. In experiments, with the objective to study the effect of levels (20 or 60 mg N/L) and forms of N (NH_4^+ and NO_3^-) under the kinetics parameters, proton extrusion, the activity of the N-assimilation enzymes and the N-partition in the plant, were conducted in greenhouse, using 5 upland rice varieties (Lageado, IAC 47, Dobradinho, Agulha e Bico Ganga), in nutrient solution. It was observed an ample variation of the kinetics parameters and biochemists, and a distinguishing behavior among varieties in the uptake and use of N. The varieties Agulha and IAC-47 had presented the best combination of K_M , $V_{m\acute{a}x}$, GS/GOGAT in conditions of high availability of N- NO_3^- , and Bico Ganga, in conditions of low availability of N- NO_3^- in nutrient solution. In another experiment, with the objective to study the assimilation and remobilização of N in season nitrate conditions, used varieties Sagrimão, Goiano, Zebu, Agulha, IAC 1278, IR08, Comum Branco, IAC 47 e Ligeiro had been cultivated in nutritional solution. The N-assimilation enzymes were studied in the leaf blades and root of 62 and 69 days old rice plants, under 20 and 200 mg $\text{mgN-NO}_3^-/\text{L}$. Under higher nitrate supply had increase the activity of the NR, GS and GOGAT in rice plants. The GS activities had been low in roots, in comparison with the activities observed in leaf. The GOGAT activity was bigger in roots, in both the treatments. The GDH-A activity occurred mainly in tissues foliar. The GDH-D activity occurred in leaf as in roots. The GDH-D activity not occurred in tissues foliar. The activity of the enzymes of N-assimilation was higher in tissues foliar. These results seem indicate the leaves as the main site of NH_4^+ -N assimilation in rice plants under higher NO_3^- -supply.

Keywords: Genetic similarity, uptake kinetic, assimilation of N

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em geral, uma coleção de genótipos apresenta variados padrões de adaptabilidade ao ambiente que se distinguem por diferentes comportamento e sensibilidades de resposta à variação ambiental, apresentando distintos níveis de produtividade (SILVA, 1995; SILVA et al., 1999).

As características de interesse presentes nesses genótipos são adaptações ao ambiente, que os capacitam a sobreviverem e persistirem frente às inumeráveis contingências (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Estudos efetuados com “variedades locais” de arroz-de-sequeiro, cultivadas no Estado do Maranhão–BR, revelaram que estas possuíam uma ampla variabilidade, que as diferenciam dos demais indivíduos dentro da população, tais como: Teor de proteína bruta no grão, cinética de absorção de amônio, eficiência de aquisição e assimilação de N, tolerância a alumínio (BAPTISTA et al., 2000, FERRAZ Jr. et al.1997, MENDONÇA, 1991; SOUZA et al, 1998;). Possivelmente, este poderia ser um metrial utilizado para ampliar a base genética dos cultivares de arroz indicado para o sistema de sequeiro, uma vez que essa é estreita (GUIMARÃES et al., 1996).

Entretanto, o sistema de agricultura tradicional fornece poucas informações sobre a variação genética e a estrutura de populações mantidas pelos agricultores. Portanto, é de fundamental importância que seja conhecida a diversidade e a genealogia dos genótipos a serem utilizados em possíveis programas de melhoramento genético (SILVA et al., 1999).

Análises de polimorfismos de DNA com marcadores do tipo RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) vêm sendo amplamente utilizados em estudos de diversidade genética (CHAGUE et al., 1996; CHEN et al., 1997; COLOMBO et al., 1998; CORRÊA et al., 1999 DELOURME et al., 1994; DUARTE, et al., 1999; ESQUIBET et al., 1998; FERREIRA ET AL., 1999; GARCIA et al., 1998, MIKLAS et al., 1993).

A diversidade genética é, em geral, quantificada por análises estatísticas multivariadas. Dentre as técnicas estatísticas multivariadas a mais usada é a análise de agrupamentos, que tem por finalidade reunir as unidades amostrais em grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre grupos (CRUZ, 1990).

É mister, também, saber informações sobre o comportamento destes genótipos em respostas a ambientes favoráveis e desfavoráveis quanto à nutrição mineral. A perspectiva de melhorar a eficiência de uso de fertilizantes em plantas, visto que o uso de altas doses de fertilizantes tem provocado redução na eficiência de absorção e utilização de nutrientes, principalmente N em cultivares (CALÇADO & ESTANISLAU, 1999; HIREL et al, 2001).

No caso de N, isso ocorre, por que os sistemas de transporte de nitrato e amônio e as atividades das enzimas de assimilação de N foram indiretamente selecionadas para menor afinidade pelo substrato – maior K_M , significando que essas proteínas precisam de maiores concentrações de fertilizantes nitrogenados para se tornarem ativas (TEIXEIRA JR., 1999).

Diante disso, a seleção de genótipos mais eficientes envolve estudos que vão além da simples identificação de plantas que possuem sistemas de transporte mais eficientes, é necessário, também, identificar genótipos mais eficientes na utilização de nutrientes, visando média/alta produtividade (CLARKSON & HAWKESFORD, 1993; VANDERMEER, 1995; VALE et al, 1998).

Desta feita, os objetivos deste trabalho foram: Verificar o grau de similaridade genética dentro de variedades de arroz, através análise de agrupamentos hierárquicos fundada em dados obtidos pela técnica de RAPD e, estudar o efeito de níveis e formas de N sob os parâmetros cinéticos de absorção de N, a extrusão de prótons, da atividade das enzimas de assimilação de N, e da partição de N na planta, e, verificar se esses parâmetros podem ser usados como marcadores moleculares bioquímicos para a seleção de variedades eficientes na absorção e utilização de N em plantas de arroz. a intensidade de

O presente estudo foi composto por três partes independentes, porém complementares entre si, com o objetivo de compreender os mecanismos envolvidos que contribuem para a eficiência de absorção do nitrogênio por plantas.

Em análise aos Objetivos Gerais fica evidente que esse é um estudo multidisciplinar, no qual uma visão holística é de fundamental importância, visto que o potencial genético das plantas estudadas expressa as características bioquímicas e fisiológicas desenvolvidas pelas mesmas como estratégia de sobrevivência a ambientes carentes em nutrientes, principalmente o nitrogênio.

2. CAPÍTULO I

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE VARIEDADES DE ARROZ (*Oryza sativa*) USANDO MARCADORES MOLECULARES RAPD

2.1 RESUMO

Descritores de DNA têm recebido especial atenção, sendo que os marcadores RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) são os mais utilizados em estudos de diversidade e relações filogenéticas. Neste trabalho, foram avaliadas as alterações provocadas por seis diferentes coeficientes de similaridade no agrupamento de 16 variedades de arroz analisadas pela técnica de RAPD. Amostras de DNA de cada variedade foram amplificadas com 20 iniciadores, sendo que apenas 15 (75%) produziram fragmentos amplificados, resultando em 90 desses fragmentos polimórficos. A análise dos resultados se constituiu na descrição do padrão de bandas, que permitiu estabelecer a “impressão digital” de cada variedade. Para o cálculo do coeficiente de similaridade foram testados os coeficientes Nei & Li, Jaccard, Ochiai, Russel & Rao, Simple Matching e Rogers & Tanimoto, sendo as comparações entre eles realizadas pela avaliação dos dendrogramas gerados pelo algoritmo UPGMA (método das médias das distâncias genéticas) e pelas correlações entre as distâncias genéticas. Os coeficientes utilizados, exceto o de Russel & Rao distinguiram as variedades em 3 (três) grupos principais de acordo com a similaridade genética. Os resultados obtidos indicam que os melhores coeficientes para determinação da similaridade obtida a partir do padrão de bandas por RAPD, são os de Nei & Li, de Jaccard e de Ochiai que foram capazes de agrupar as variedades com alta similaridade, enquanto os coeficientes Simple Matching e de Rogers & Tanimoto foram ligeiramente inferiores colocando variedades distantes no mesmo grupo.

Palavras-chave: Filogenia, marcadores de DNA, agrupamento de cultivares

2.2 ABSTRACT

DNA describers have received special attention, recently, among them; RAPD markers (Random Amplified Polymorphic DNA) have been used in studies of diversity and phylogenetic relationships. We have studied the influence of using six different coefficients of similarity when grouping 16 varieties of rice analyzed by the RAPD technique. DNA samples of each one of these varieties were amplified using 20 primers, only 15 (75%) of which produced amplified fragments, comprising 90 of these were polymorphic fragments. The analysis of the results gave the description of the standard of bands, producing a “fingerprint” for each variety. For the calculation of the similarity index several coefficients were tested: Nei & Li’s, Jaccard’s, Ochiai’s, Russel & Rao’s, Simple Matching and Rogers & Tanimoto’s. Comparison among them was carried out through the evaluation of the dendrograms generated by the UPGMA algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) and by the correlations between the genetic pitches. The Nei & Li, Jaccard, and Ochiai coefficients discriminated the varieties in three main groups according to their genetic similarities. Our results show that the coefficients of Nei & Li, Jaccard and Ochiai adjusted better the groups with high genetic similarities. While the coefficients Simple Matching and Rogers & Tanimoto were not as efficient, banding together varieties that are genetically different.

Key words: Phylogeny, DNA markers, grouping of cultivars

2.3 INTRODUÇÃO

Estimativas indicam que, acima de 75% da produção mundial de alimentos provém de pouco mais de 25 espécies domésticas de plantas e animais. A manipulação e manejo destes recursos genéticos são para a segurança alimentar do mundo. A pressão por aumento de produtividade e sustentabilidade dos sistemas de produção é intensa e crescente. Assim, a identificação e desenvolvimento de germoplasma vegetal que seja altamente produtivo e adaptado às condições ecológicas é uma prioridade mundial reconhecida pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (QUEROL, 1993).

O Brasil situa-se entre os países com maior variabilidade genética disponível para a pesquisa agrícola. A variabilidade genética em plantas pode ser considerada em dois níveis complementares. Em uma conceituação inicial, a diversidade refere-se ao número de espécies vegetais em um dado ecossistema ou região. Em uma conceituação mais ampla, a diversidade inclui a variação genética existente em cada espécie e a coexistência de vários fenótipos variantes, distintos, comuns e geneticamente determinados em uma população. Neste caso, é mais comumente referida como variabilidade genética ou polimorfismo. O polimorfismo constitui uma fonte de alelos variantes para estudos de diversidade genética, pois, embora só dois alelos de um gene possam existir numa célula diplóide, o número total de formas alélicas diferentes é bem grande numa população (MARTINS, 1994).

A forma mais importante de manutenção e conservação da diversidade agrícola é o cultivo por agricultores tradicionais. O termo agricultura tradicional designa sistemas agrícolas que são caracterizados pela prevalência de técnicas utilizadas por gerações contínuas de agricultores e transmitidas através de tradição oral. Uma das características deste sistema é a grande diversidade inter e intraespecífica de espécies cultivadas e conservação de germoplasma em seus respectivos ambientes (PERONI et al., 1999).

Estudos indicam que, nos países do terceiro mundo, do total da área cultivada com trigo, arroz e milho, 50% são cultivadas com variedades locais (CLEVELAND et al., 1994). Sob o ponto de vista agrícola, as etnovariedades ou variedades locais representam recursos genéticos agrícolas que vêm sendo coletados e utilizados pelos centros de germoplasma.

As características de interesse presentes nesses genótipos são adaptações a seu ambiente, que os capacitam a sobreviverem e persistirem frente às inumeráveis contingências que os rodeiam. Ao longo do tempo, esses passam a ter uma variabilidade genética herdável, e, portanto, passam a possuir um genótipo distinto, que os diferenciam dos demais indivíduos dentro de uma população (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

As “variedades locais” de arroz do Maranhão –BR apresentam grande variação quanto ao teor de proteína bruta no grão (FERRAZ Jr. et al., 1997). Análises de cinética de absorção de amônio também demonstraram variação na eficiência de aquisição de N por essas plantas (BAPTISTA et al., 2000). Deste modo, este material apresenta um grande potencial para o melhoramento de plantas para a agricultura sustentável nas condições dos trópicos úmidos.

O sistema de agricultura tradicional fornece poucas informações sobre a variação genética e a estrutura de populações mantidas pelos agricultores. Sendo por este motivo, difícil ter garantia sobre a origem de certas variedades (PERONI et al., 1999).

Por muitos anos, os princípios da genética têm sido aplicados como base para o melhoramento vegetal e para caracterização de genótipos, com grande sucesso. Várias

espécies cultivadas como o milho, trigo, tomate e arroz, têm sido usadas como modelos genéticos para o melhoramento por causa de sua importância central na produção de alimentos. Até recentemente, tanto o melhoramento genético como a caracterização de genótipos têm se baseado no fenótipo. A eficiência do esquema de seleção baseada no fenótipo, é limitada, uma vez que este é função de fatores como, o meio ambiente, a multigenia, a herança quantitativa e qualitativa, que quase sempre confundem a expressão do genótipo. Muitas das complicações dos testes baseados em fenótipos, podem ser atenuadas através da identificação do genótipo com um teste diagnóstico baseado no DNA. Por essa razão, as marcas genéticas baseadas no DNA estão sendo importantes para o melhoramento vegetal. A caracterização de variedades cultivadas tem sido feita utilizando-se técnicas moleculares baseadas na obtenção de uma impressão digital, característica de cada variedade. Dentre os descritores moleculares, os marcadores do tipo RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) estão entre os mais utilizados e difundidos.

Em estudos de diversidade genética, vários métodos para a análise de agrupamentos têm sido usados, sendo os mais comuns os de agrupamentos hierárquicos. Este método baseia-se no desenvolvimento de uma matriz simétrica de coeficientes de associação e combinação de itens, segundo níveis hierárquicos de similaridade, utilizando um procedimento aglomerativo, de modo que cada ciclo de agrupamento obedeça a uma ordem sucessiva no sentido do decréscimo de similaridade. Os coeficientes de similaridade representam o grau de semelhança entre pares de objetos, que possibilitam que os mesmos sejam agrupados segundo uma disposição hierárquica.

Os resultados quando organizados em gráfico, do tipo dendrograma, mostram as relações de similaridades das amostras. Como não há testes estatísticos válidos para os resultados oriundos da análise de agrupamento, o pesquisador geralmente fica em dúvida sobre qual método aplicar.

Recomenda-se que esta análise seja aplicada com bom senso, para ter mérito, e a consideração de ordem pragmática a ser adotada é que o melhor método é aquele que fornece os resultados mais coerentes com a realidade em estudo.

Os objetivos específicos deste capítulo foram: estudar as técnicas moleculares para caracterização de dezesseis variedades de arroz procedentes do Estado do Maranhão, realizar a otimização metodológica do protocolo da técnica de RAPD, e comparar diferentes coeficientes de similaridade nas análises de agrupamento das variedades de arroz.

2.4 REVISÃO DE LITERATURA

2.4.1 O Material Genético

Exceto em vírus de RNA, o material genético de todos os organismos é o DNA. As propriedades do ácido desoxirribonucléico – **DNA** - são estudadas desde o nível de células ao de populações. As células contêm um ou mais conjuntos de uma coleção de DNA característicos da espécie chamada **genoma**. O genoma pode ser subdividido em cromossomos, contendo cada um, uma longa e única cadeia de DNA. Por sua vez o cromossomo pode ser demarcado ao longo de seu comprimento em milhares de regiões funcionais chamadas **genes**, e em regiões cuja função ainda não são bem compreendidas. Por exemplo: Cada célula de arroz tem 24 cromossomos em dois conjuntos equivalentes – genomas (2n). Cada um dos cromossomos em um genoma é único, só se assemelha a seu equivalente no outro conjunto e aos demais cromossomos do mesmo tipo no resto dos membros da espécie *Oryza sativa* (LEHNIGER et al., 2000).

Nos procariotos esse material é organizado em um único “cromossomo” circular e em eucariontes é organizado juntamente com proteínas histônicas, numa série de cromossomos lineares que se encontram no núcleo.

A molécula helicoidal de duas fitas de DNA, se encontra de forma contínua em toda a extensão do cromossomo, consiste em uma série de pares de bases, cada par constituído por uma purina (adenina, A, ou guanina, G) acoplada a uma pirimidina específica (timina, T ou citosina, C). Uma fita é de tal modo estruturada, que sua polaridade é evidente de uma extremidade (o final 5') à outra extremidade (a 3'). Esta polaridade tem conseqüências importantes durante a formação de uma cópia de DNA ou RNA de um DNA molde, uma vez que todas as polimerases conhecidas (enzimas copiadoras da fita) movem-se somente na direção de 3' para 5' na fita matriz, criando uma cópia com polaridade oposta (polimerização).

2.4.2 Métodos Moleculares

Nos últimos anos, o interesse pela avaliação de cultivares tem aumentado muito no mundo inteiro. O motivo principal tem sido a crescente necessidade de proteção de cultivares comerciais e de genótipos nativos, devido ao potencial que essas plantas possuem para a indústria e agricultura.

Tradicionalmente, os melhoristas têm utilizado descritores morfológicos para caracterização de genótipos. E, embora esta forma continue sendo predominante e importante, as limitações deste tipo de descritor têm gerado a necessidade de busca de alternativas mais eficiente.

Uma das limitações é a linha tênue que diferencia variedades e cultivares. Conceitualmente, variedades tradicionais são as melhoradas pelos agricultores durante um período de centenas de anos e variedades modernas (ditas “cultivares”), as melhoradas por programas de melhoramento genético durante um período de cinco a quinze anos. A similaridade morfológica torna-se, portanto, a definição de variedades e cultivares complexa, tornando-se necessário utilizar formas de identificação que definem os alelos presentes em uma população e a frequência de cada um deles. A principal diferença, à nível de variabilidade genética, é que variedades mantêm ampla e marcadamente diferenças entre si, enquanto as cultivares têm uma base genética uniforme e se diferenciam em relativamente poucos alelos (QUEROL, 1993).

Devida a relação genética próxima entre as cultivares/variedades, tem-se buscado técnicas eficientes para caracterização e avaliação de características que diferenciem esses genótipos numa população à nível de mapeamento de genoma, utilizando marcadores moleculares (PERONI et al., 1999).

Num primeiro momento surgiram os descritores bioquímicos. Mais recentemente, os descritores de DNA, baseados nos genótipos de indivíduos, têm recebido atenção especial, especialmente pelo seu potencial de distinção de genótipos morfológicamente similares e geneticamente aparentados.

2.4.3 Evolução dos Descritores.

Diferenças entre os cromossomos de dois indivíduos podem ser detectadas de várias maneiras, algumas vezes podem ser feitas por observação casual entre os indivíduos (descritores morfológicos ou marcadores visuais), outras vezes por ensaios enzimáticos (descritores bioquímicos ou marcadores moleculares aloenzimas / izoenzimas) e ainda por análise do próprio DNA (descritores de DNA ou marcadores moleculares).

Desta forma, os três tipos de descritores disponíveis são: os morfológicos, os bioquímicos e os de DNA.

Os descritores morfológicos são características fenotípicas de indivíduos, resultante da expressão gênica, ou seja, da interação do genótipo com o ambiente. Apesar desses descritores terem um papel fundamental na divulgação de novos materiais genéticos, porém, quando se trata da distinção de genótipos aparentados, os descritores morfológicos apresentam limitações, especialmente, em cultura de base genética estreita (SMITH & SMITH, 1988).

Em 1959, Market & Moller (citado por AAGAARD et al., 1998) mostraram que diferenças genéticas poderiam ser detectadas em ensaios com enzimas (isozenzimas) através de diferenças na taxa de migração através de uma matriz de gel, em resposta a um campo elétrico.

O emprego de descritores bioquímicos passou a ser efetivamente utilizados na construção de mapas genéticos de várias espécies e na caracterização de cultivares, a partir da década de 1970. Isto representou um avanço para o melhoramento de planta, pois possibilitou a obtenção de estimativas de distância genética entre os genótipos e, assim uma maior resolução da variabilidade existente (AAGAARD et al., 1998).

Em 1980, dez anos depois, os primeiros trabalhos com descritores de DNA surgiram. Botstein e colaboradores (1980) encontraram um grande número de marcadores moleculares num estudo de diferença na hereditariedade da molécula de DNA. A principal vantagem do emprego desse tipo de descritores está na capacidade de detectar variação genética adicional. Em geral, plantas têm cerca de 10^8 a 10^{10} nucleotídeos no DNA total. Se uma pequena fração desses diferirem entre dois indivíduos um enorme número de marcadores potenciais são resultantes (PATERSON et al., 1991).

O avanço principal que as técnicas moleculares trouxeram, foi a possibilidade de acessar diretamente o genótipo de um indivíduo, evitando dessa maneira, a expressão do fenótipo e a influência do ambiente sobre esse. Enquanto os descritores de proteína amostram principalmente as regiões ativas da expressão gênica, os de DNA permitem ampla amostragem do genoma de um indivíduo. O fato de haver um número quase ilimitado de descritores de DNA disponíveis e em razão de possibilitarem o acesso à variabilidade genética em diversas espécies vegetais, faz com eles sejam de grande importância para a caracterização de cultivares.

2.4.4 Marcadores Moleculares

Marcadores moleculares são características específicas no sequenciamento do DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente. Essas características podem estar presentes em regiões expressas ou não do DNA (SANO et al., 1997).

Para ser útil como marcador molecular uma característica necessita de dois critérios básicos: (i) a característica deve diferenciar dois indivíduos, e (ii) a característica pode ser reproduzida (PATERSON et al., 1991).

Muitos são os aspectos envolvidos na escolha do tipo de marcador molecular a ser utilizado, portanto não existe aquele que possa ser considerado superior para todos os atributos, como: consistência, tempo para obtenção de resultados, nível de polimorfismo, custo e facilidade. Portanto, as opções disponíveis devem ser analisadas antes de ser decidido o tipo de marcador a ser empregado.

Os distintos tipos de marcadores moleculares disponíveis diferenciam-se pela tecnologia usada para revelar a variabilidade ao nível de DNA e podem ser classificados em dois grupos básicos, de acordo com o método empregado: hibridização ou amplificação do DNA (BERED et al., 1997). É importante ressaltar que os marcadores moleculares são complementares, pois eles marcam regiões diferentes do cromossomo. Portanto, as informações obtidas por um tipo de marcador não anulam as obtidas por outro marcador (BERED et al, 1997).

2.4.5 Marcadores Moleculares Baseados em Hibridização

Entre os marcadores identificados por hibridização estão: (A) os marcadores que detectam o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e (B) os que detectam o polimorfismo presente nas seqüências hipervariáveis do genoma (minissatélites ou locos VNTR).

Resumidamente as etapas envolvidas por essas técnicas são: extração de DNA, digestão com enzima de restrição, separação dos fragmentos por eletroforese, transferência dos fragmentos de DNA para uma membrana de nitrocelulose, hibridização com sonda molecular radiotiva específica, Exposição da membrana para revelação da radiotividade.

Portanto, a visualização dos fragmentos polimórficos é feita através da hibridização de seqüências homólogas entre sondas de DNA e os fragmentos de interesse imobilizado na membrana. Desta maneira, somente os fragmentos fixados na membrana que são homólogos ao DNA da sonda serão visualizados entre os milhares de fragmentos resultantes do corte com a enzima de restrição. Estas técnicas permitem identificar dentro do genoma as seqüências de interesse.

2.4.6 RFLP

A técnica do polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição –RFLP– proposta por Botstein et al. (1980) consiste na fragmentação do DNA total através do uso de enzimas de restrição e na observação por hibridação destes fragmentos com seqüências homólogas específicas de DNA (sondas) marcadas com radiotividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência. Para que o polimorfismo seja detectado é necessário que as seqüências de bases de DNA dos indivíduos sejam distintas. A característica básica de RFLP baseia-se na homologia das seqüências de nucleotídeos em fragmentos de DNA, isto qualifica esta técnica para mapeamentos comparativos. A premissa básica é que bandas observadas em uma mesma posição no

gel possuem seqüências homólogas de nucleotídeos, enquanto que bandas em posições distintas no gel possuem seqüências parcialmente homólogas, sendo possível observar a conservação na ordem relativa de locus nos cromossomos (síntenia) (BOTSTEIN et al.,1980)

Marcadores RFLP detectam variações em seqüências de DNA de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas pelas enzimas de restrição. O polimorfismo entre indivíduos pode ocorrer devido à mutação de ponto, deleção, inserção ou inversão (BOTSTEIN et al.,1980). O polimorfismo pode ser detectado com essa técnica pelo uso de diferentes enzimas de restrição e, ou, pelo emprego de diferentes sondas moleculares.

Os marcadores RFLPs têm sido usados em grande número de estudos de caracterização de cultivares (AHN et al. 1992, AHN et al., 1993; AHN & TANKSLEY, 1993).

Em arroz, Zhang et al.(1992 e 1997) identificaram a diversidade genética entre 12 variedades do grupo *indica* e 14 variedades do grupo *japônica*. Eles usaram três enzimas de restrição e 49 sondas para selecionarem marcadores RFLP presentes no mapa num intervalo de 20-30 cM. Nesse ensaio foi possível através de diferentes combinações entre enzimas/sondas detectar um alto grau de polimorfismo entre os acessos. Os autores concluíram que dentro das variedades do grupo *indica* há maior diversidade genética do que dentro do grupo *japônica*. As diferenciações foram detectadas em 11 dos 12 cromossomas do arroz. Eles atribuíram essa diversidade a eventos moleculares que incluem substituições de bases, deleções e inserções ocorridas no genoma do grupo *indica* devido a distinta distribuição eco-geográfica deste grupo, que é cultivado tanto em regiões tropicais quanto subtropicais.

Os marcadores RFLP tem sido utilizados, também, na construção de mapas genéticos comparativos, e têm-se encontrado regiões bastante conservadas, entre várias espécies agrícolas. Por exemplo, mapas genéticos revelaram que os genomas de tomate e batata são aproximadamente idênticos no conteúdo geral dos genes e na ordem dos genes. Similarmente, relações de conservação têm sido reportadas entre sorgo e milho, e entre arroz, milho e trigo (AHN et al., 1993; AHN & TANKSLEY, 1993). Esses dados são de grande relevância, pois, se duas espécies mostram alto grau de conservação genética, as informações genéticas de uma espécie pode ser usada para a outra.

Marcadores RFLP têm sido empregados com sucesso também na identificação e localização de genes de interesse agrônômicos. Em beterraba, Boudry e colaboradores (1994) usando marcadores RFLP (pKP591:3.8) fizeram a localização precisa dos gene dominante Bb que codificam a ausência completa ou parcial de vernalização, esses marcadores permitiram também verificar que aqueles genes estavam ligado ao gene Rr que confere a cor vermelha ao hipocótilo.

RFLP constitui uma das classes de marcadores moleculares mais utilizadas em genética e melhoramento de plantas. Entretanto, a técnica de RFLP detecta relativamente pequena quantidade de polimorfismo genético, é mais cara e de difícil implementação em processos de rotina em comparação com as recentes técnicas que utilizam a Reação em Cadeia da Polimerase - PCR como o uso de marcadores RAPD e ISSR-PCR (ZHU et al., 1998).

2.4.7 Microssatélites ou VNRT

Grande parte do genoma de eucariontes é composto de seqüências repetidas de DNA. Essas seqüências são encontradas agrupadas ou dispersas ao longo do genoma nuclear, formando sítios altamente variáveis em termos estruturais (polimórficos). As várias classes de seqüência repetitivas de DNA diferenciam-se no número e composição dos nucleotídeos. Uma dessas classes são as seqüências hipervariáveis -VNTR- ou seja, seqüências adjacentes que se repetem em número variável.

Um loco hipervariável, também chamado minissatélite, é constituído de um número variável de seqüências idênticas repetidas lado a lado. Essas seqüências possuem de 15 a 100 pares de bases, e em cada loco hipervariável são repetidas até 50 vezes. Essas seqüências possuem uma proporção de pares de bases C≡G diferentes da média do resto do genoma (MILACK, 1998).

A técnica de VNTR, proposta por Jeffreys et al. (1985), além de explorar o polimorfismo de comprimento de restrição em cada loco hipervariável, explora também o polimorfismo no número e distribuição destes locos ao longo do genoma, possibilitando a amostragem de diversas regiões do genoma simultaneamente, causando uma impressão digital genética (genetic fingerprint).

A técnica de minissatélites ou locos VNTR é similar a do RFLP, variando basicamente o tipo de sonda utilizado, e apresentando as mesmas vantagens e desvantagens do RFLP, porém, com uma vantagem adicional - o alto grau de polimorfismo, decorrente da variação na distribuição dos sítios de restrição, das sondas utilizadas, e do número e tipos das seqüências repetitivas. O alto grau de polimorfismo é uma característica importante, pois reduz o número de sondas a serem usadas para caracterização de genótipos. Nybom et al (1990) caracterizaram quatro cultivares de *Malus sp*, quatro de *Prunus sp*, e oito de *Rubus sp*, usando somente uma sonda de microssatélite.

Uma das dificuldades de utilização deste método é que os iniciadores usados são específicos para cada espécie. A construção de iniciadores específicos juntamente com o emprego de eletroforese utilizando gel de acrilamida e o uso de radioatividade para visualização das bandas faz com que os custos dessa técnica sejam muito caros (FERREIRA & GRATAPAGLIA, 1995).

2.4.8 Marcadores Moleculares Baseados em PCR

A classe de marcadores identificados por amplificação de DNA está baseada na reação da cadeia de polimerase -PCR. As técnicas baseadas em PCR diferenciam-se basicamente nos tipos de iniciadores e géis usados para resolução dos fragmentos de DNA. A amplificação de DNA, usando a reação em cadeia da polimerase é um método fácil, rápido, versátil e sensível, tornando-o particularmente apropriado para estudos genéticos moleculares envolvendo um número elevado de indivíduos (SLIGHTOM et al., 1995).

A PCR foi desenvolvida por Mullis e Faloona (1987) e consiste na amplificação (síntese) de fragmentos específicos de DNA *in vitro*, flanqueados por dois iniciadores hibridizados em fitas opostas complementares do DNA de interesse. Toda a reação ocorre na presença das enzimas polimerases (em geral, Taq-polimerase - *Thermus aquaticus*). Os iniciadores são oligonucleotídeos de até 25 pares de base sintetizados artificialmente de maneira que suas seqüências de nucleotídeos sejam complementares a seqüências específicas que servem de iniciação na síntese de DNA pela enzima Taq-polimerase.

A reação de PCR consiste em três passos básicos: (i) desnaturação do material genético alvo e separa o dos elementos da hélice; (ii) hidroliza o ou anelamento dos componentes ligados às bases complementares; (iii) síntese de DNA alvo (molde) pela Taq-polimerase. Ciclos constantes de desnatura o, anelamentos dos iniciadores e extensão da fita de DNA resultam na amplifica o do fragmento alvo. As novas fitas produzidas servem como molde para rea o es sucessivas de duplica o do DNA. A enzima Taq-polimerase pode ler o código e incorporar rapidamente o nucleotídeo complementar, o que   uma grande vantagem da técnica da rea o em cadeia da polimerase. Uma desvantagem desta técnica   a necessidade prévia de conhecimento

das seqüências de nucleotídeos, que delimitam o fragmento de DNA de interesse, para construção de iniciadores na amplificação via PCR (SLIGHTOM et al., 1995).

Os marcadores baseados em PCR serão a seguir descritos:

2.4.9 RAPD

A técnica de RAPD foi desenvolvida no início da década de 1990 e dois tipos de técnicas de amplificação de fragmentos de DNA baseadas na reação em cadeia da polimerase usando iniciadores de seqüência arbitrária foram publicadas concomitantemente (WILLIAMS et al., 1990; WESLSH & MCCLELLAND, 1990).

O trabalho desenvolvido por Welsh & McClelland (1990), chamado iniciadores arbitrários dirigindo a amplificação por PCR (AP-PCR), envolveu a amplificação de DNA genômico de arroz utilizando iniciadores relativamente longos com 20 a 34 nucleotídeos. O desenvolvimento dessa técnica foi uma tentativa de amenizar a desvantagem presente na técnica de PCR de ter necessidade de conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeo para se construir iniciadores específicos. Apesar da técnica ter sido um sucesso, produzindo um grande número de bandas reproduzíveis; todavia, o emprego de eletroforese utilizando gel de acrilamida e o uso de radiatividade para visualização das bandas tem limitado o uso dessa técnica.

A metodologia desenvolvida por Williams et al. (1990) para análise de DNA genômico de soja, denominada de técnica do DNA polimórfico amplificado ao acaso – RAPD, consiste na amplificação simultânea de vários locus do genoma, utilizando iniciadores de seqüências arbitrárias, contendo 9 a 10 pares de base e tendo composição G + C (guanina/citosina) igual ou superior a 50%. Sempre que o genoma a ser analisado apresentar uma seqüência de nucleotídeos correspondente ao do iniciador, o processo de amplificação será iniciado, portanto as diferenças ao nível de DNA são inferidas pela presença ou ausência de um determinado fragmento amplificado.

As diferenças entre a técnica de RAPD e a técnica AP-PCR são o uso de iniciadores mais curtos com 9 a 10 nucleotídeos de extensão e a utilização de eletroforese utilizando gel de agarose sem radiatividade para visualização das bandas. Isso simplificou a aplicação da técnica de PCR, tornando-se mais fácil à manipulação e diminuindo o custo, possibilitando desta maneira a sua aplicação em diversos laboratórios. Indiscutivelmente, a simplicidade da técnica de RAPD é a chave para a sua aceitabilidade universal.

A técnica de RAPD possui duas características que o distingue das demais baseadas em PCR: uma é a utilização de um iniciador único ao invés de um par de iniciador; e a outra é que o iniciador único tem seqüência arbitrária, e portanto sua seqüência dentro do DNA genômico onde ocorrerá o anelamento é desconhecida (TINGEY & del TUFO, 1993).

O grande avanço dessas duas técnicas está na utilização de iniciadores de seqüências arbitrárias de nucleotídeos para dirigir a reação de amplificação de segmentos de DNA genômico, eliminando a necessidade de conhecimento prévio da seqüência (WILLIAMS et al., 1990; WESLSH & MCCLELLAND, 1990).

Uma característica fundamental dos marcadores RAPD é o fato deles se comportarem como marcadores genéticos dominantes. Portanto, a detecção dos segmentos RAPD não tem sensibilidade quantitativa suficiente para discernir se um segmento de amplificação originou-se de um indivíduo diplóide homocigoto (AA) ou de um heterocigoto (Aa), pois o genótipo recessivo (aa) é identificado pela ausência da banda no gel e os genótipos homocigoto e heterocigoto não se distinguem uma vez que ambos apresentam a presença da banda no gel (WILLIAMS et al., 1990).

A frequência de amplificação de um fragmento RAPD depende da probabilidade do iniciador utilizado encontrar duas seqüências complementares (sítios de iniciação) em orientação opostas ao longo do DNA e a uma distância de no máximo alguns milhares de pares de bases (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). A competitividade de um sítio de amplificação arbitrária é determinada essencialmente pela homologia com o iniciador utilizado. Em ensaios RAPD, o pareamento perfeito na extremidade 3' do iniciador, a partir do qual a polimerização inicia, parece ser mais crítico do que na extremidade 5' (TINGEY & del TUFO, 1993).

Os marcadores RAPD podem detectar várias fontes de polimorfismos como deleções, inserções e mutações. É uma técnica simples e rápida, que permite verificar diferenças genéticas entre e dentro das espécies, a baixo custo.

Em teoria, a análise RAPD poderia ser de grande auxílio em detectar marcadores polimórficos mais rapidamente do que a análise RFLP (BOTSTEIN et al., 1980). Na prática, parece que a frequência de polimorfismos detectada por iniciadores randômicos é menor que a detectada por sondas RFLP. A diferença observada entre a prática e teoria deve-se, provavelmente, ao fato de haver diferenças na organização na seqüência do DNA entre cereais e outras espécies de plantas (PARTERSON et al., 1991). Esses fatos têm restringido a aplicação desta técnica para a construção de mapas genéticos. Contudo, a técnica RAPD tem sido muito boa na caracterização genética de plantas ("impressão digital").

MacKill (1995) com o objetivo de quantificar a diversidade genética de 134 cultivares de arroz do grupo *japônica* e *indica*, utilizou dez iniciadores de seqüências arbitrárias para dirigir a amplificação do DNA de interesse. Esses iniciadores produziram 30 bandas polimórficas bem nítidas, que permitiram gerar um dendrograma (UPGMA), o qual apresentou dois agrupamentos distintos, um formado por cultivares do grupo *indica* e outro formado por cultivares do grupo *japônica*, sendo que ainda possível distinguir entre os cultivares *japônica* cultivados em clima tropicais e os cultivados em climas temperados. Diante dos resultados obtidos o autor observou que há maior diversidade genética dentro do grupo de cultivares *japônica*.

Hinrichsen e colaboradores (1996) identificaram com facilidade variedades de arroz chilenas usando marcadores moleculares do tipo RAPD. Eles utilizaram 22 iniciadores, sendo que somente dez geraram bandas polimórficas, que permitiram identificar através de seu perfil eletroforético as variedades analisadas. Os autores verificaram que apenas utilizando quatro destes iniciadores já era possível discriminar as variedades estudadas.

Para estudar a diversidade genética de progenitores e linhagens de soja que seriam usados em um programa de melhoramento com o objetivo de eliminar a enzima lipoxigenase presente em semente de soja, empregando a técnica de RAPD, Vilarinhos et al. (1994) testaram 23 iniciadores de seqüências arbitrárias, sendo que somente 13 produziram 61 fragmentos polimórficos, que permitiram estabelecer o perfil molecular de cada genótipo. Os marcadores RAPD gerados possibilitaram distinguir as linhagens e os progenitores brasileiros dos asiáticos.

Duarte et al. (1999) avaliaram a diversidade genética de 27 cultivares de feijão de diferentes variedades. Foram utilizados 33 iniciadores que geraram 265 produtos amplificados, dentre esses somente 137 eram polimórficos. Esse número de fragmentos foi mais que suficiente para evolução da diversidade genética. Os autores empregando a análise de Bootstrap mostraram que 50 bandas polimórficas já eram suficientes para produzirem um dendrograma com os mesmos agrupamentos gerados com os 137 marcadores usados.

Embora a técnica RAPD tenha grandes vantagens, a sua grande limitação está na reproducibilidade dos marcadores obtidos. A sensibilidade da reação dificulta a

comparação dos resultados gerados pela técnica RAPD produzidos por diferentes laboratórios, sendo esta a grande preocupação dos pesquisadores.

A técnica de RAPD é bastante sensível. Pequenas modificações na concentração dos componentes da reação, reagentes químicos e equipamentos são capazes de produzir alterações no padrão dos marcadores obtidos. Em decorrência disso é recomendável uma otimização cuidadosa das condições experimentais para que se possam obter amplificações reproduzíveis e confiáveis (CHEN et al., 1997).

A otimização das condições da reação tem como objetivo obter o equilíbrio entre especificidade e eficiência da amplificação. Essas condições também afetam a sensibilidade de detecção, que para diagnósticos é altamente desejável. Os fatores a considerar na otimização da reação de polimerase em cadeia -PCR incluem um bom planejamento dos oligonucleotídeos iniciadores (comprimento e composição), da concentração do DNA molde, das concentrações de sais, da concentração da enzima e dos nucleotídeos, da temperatura e do tempo dos ciclos. Na literatura observa-se uma grande variação entre espécies de plantas, inclusive dentro da mesma espécie (DEVOS & GALE., 1992) com respeito aos protocolos de RAPD utilizados.

Um dos principais fatores críticos é a condição de estringência da reação que é controlada principalmente pela temperatura de anelamento e pelo conteúdo de “CG” do oligonucleotídeo iniciador. A estringência da reação tem interferência nas condições de anelamento do iniciador ao DNA genômico molde. Assim, tem-se uma condição mais estrigente quando é mais difícil ocorrer o anelamento. A aplicação prática desse fato reside em que diferentes condições de estringência produzem resultados diferentes com relação ao número de fragmentos que será amplificado (SKROCH & NIENHUIS, 1995).

Da mesma forma, a concentração de íon Mg na reação pode influenciar a reproducibilidade dos produtos gerados na análise de RAPD. Como o magnésio é um catalizador enzimático, a sua concentração afetar a eficiência de ligação dos oligonucleotídeos iniciadores e a atividade da enzima polimerase. Portanto, a concentração de iniciadores e de Taq-polimerase devem ser determinadas em conjunto com a concentração de Mg (CHEN et al., 1997; DEVOS & GALE., 1992).

Em arroz, um estudo comparativo dos produtos de amplificação gerados pela análise de RAPD foi realizado, utilizando-se diferentes concentrações de DNA genômico, íon Mg, iniciadores e da enzima Taq polimerase conjuntamente na mesma reação. Virk e colaboradores (1995) observaram resultados variáveis em termos de números de fragmentos amplificados. E concluíram que a concentração da enzima juntamente com as concentrações de Mg e iniciadores influenciam a reprodução do padrão de bandamento. De acordo com os autores a realização de testes para otimização dos protocolos de reação é uma etapa fundamental na análise de RAPD.

2.4.10 SCAR (Seqüência Caracterizada por Regiões Amplificadas).

A técnica de Regiões Amplificadas Caracterizadas por Seqüência (SCAR), constitui-se na conversão de marcadores RAPD, de seqüência arbitrária, para marcadores de PCR de seqüência específica. Os marcadores SCAR são fragmentos de DNA genômico localizados em um loco geneticamente definido identificados por PCR utilizando um par de iniciadores específicos, desenvolvidos com base em seqüências já mapeadas ou caracterizadas (PARAN & MICHELMORE, 1993).

Muitos desses iniciadores específicos são obtidos a partir da conversão de marcadores RAPD em SCAR. Em geral, esses iniciadores têm em média 20 pares de bases, o que permite utilizar uma temperatura de anelamento mais alta, garantindo maior estringência da reação. Essa conversão em geral resulta em diminuição do nível de polimorfismo obtido por SCAR, a qual pode ser amenizada com digestão enzimática

de restrição dos produtos amplificados e, com o seqüencialmente das bandas monomórficas e subsequente desenvolvimento de iniciadores que amplificam seqüências mais variáveis entre os genótipos.

2.4.11 STS (Seqüência repetida específica) ou ASA (Amplificação Específica do Fragmento)

É uma técnica de conversão de marcadores RFLP em marcadores baseados em PCR, foi desenvolvida com o objetivo de uniformizar a linguagem entre laboratórios. Este processo foi denominado de STS, sítios marcados por seqüência, pois consistem em seqüenciar as extremidades das sondas RFLP e com a informação recuperar os fragmentos polimórficos (PARAN & MICHELMORE, 1993).

2.4.12 SSR (Seqüência Simples Repetida) ou Microssatélites

A técnica de Seqüência Simples Repetida (LITT & LUTTY, 1989) também denominada de Polimorfismo no Comprimento de Seqüência Simples (SSLP) consiste de pequenas seqüências com um a quatro nucleotídeos de comprimento repetidas em "tandem". Em genomas de eucariontes estas seqüências simples são mais freqüentes, geralmente distribuídas ao acaso e formam locos genéticos muito mais polimórficos do que os minissatélites. Em plantas tem-se observado que os oligonucleotídeos TG e GATA/GACA são seqüências repetitivas com uma freqüência de um a cada 50 mil pares de bases.

Cada microssatélite, independente do elemento repetitivo (CA/TA/AT) constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo diferente do mesmo loco.

Locos SSR parecem ser somaticamente estáveis, possuem expressão co-dominante e são multialélicos. Chama-se expressão co-dominante quando ambos os alelos de genótipos homocigotos e heterocigotos de um dado loco são facilmente identificados, pois os alelos de um loco são expressos e visualizados.

Os mecanismos que causam a variação no tamanho dos microssatélites não são bem conhecidos. O erro durante a replicação, causado pela polimerase, tem sido proposto como um dos mecanismos de mutação (AKAGI et al., 1998). Além disso, o conhecimento da origem evolucionária dos microssatélites é limitado. Messur et al. (1996) verificaram que substituições nucleotídicas em primatas criavam di ou tetranucleotídeos repetidos. Concluíram que tais mutações ocorreram de forma diferenciada durante a evolução das espécies.

Desta maneira, marcadores microssatélites têm sido utilizados para identificar várias espécies de plantas (AKKAYA et al., 1992; WU & TANKSLEY, 1993; AKAGI et al., 1998).

Muitos marcadores microssatélites têm sido identificados em *O. sativa*. Porém, dois pares de microssatélites (gêmeos) encontrados em duplicatas em segmentos dos cromossomos 11 e 12, levam a crer que esses marcadores podem ter sido originados de uma molécula comum durante a evolução do gênero *Oryza* e, portanto, poderiam ser usados em estudos para melhor compreensão da evolução do gênero *Oryza* (Panaud et al., 1996). Esses microssatélites constituem diferentes alelos que se diferenciam pelo repetição de uma seqüência simples (TAA)_n, que caracteriza cada espécie e até mesmo subespécie do gênero *Oryza* (PANAUD et al., 1996).

Akagi et al. (1998) estudando a evolução de microssatélites gêmeos em arroz, concluíram que esses surgiram antes da domesticação do gênero *Oryza*. A partir das características dos microssatélites foi possível verificar que as subespécies Japônica e

Indica se diferenciaram antes da domesticação do arroz. E provavelmente que o ancestral da subespécie Japônica sofreu diferenciação antes do ancestral da subespécie Indica e do gênero *O. glaberrima*.

2.4.13 AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados)

A técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados, desenvolvida por Virk et al. (1998), representa a mais recente tecnologia para obtenção de um grande número de marcadores distribuídos em genomas de procariotos e eucariontes. Consiste em quatro etapas: 1^a: O DNA genômico total é clivado por duas enzimas de restrição, uma de corte raro e outra de corte freqüente, nesta ordem; 2^a: Adaptadores específicos que possuem terminais complementares às extremidades dos fragmentos clivados. Em geral, esses adaptadores possuem de 20 a 30 pb; 3^a: Seleção de uma fração de fragmentos clivados serão amplificada via PCR, utilizando iniciadores com a seqüência dos adaptadores e mais 2 a 3 nucleotídeos de seqüência arbitrária na extremidade 3'; 4^a- Na subpopulação de fragmentos amplificados, somente são encontrados aqueles fragmentos que possuem seqüência complementar à seqüência arbitrária adicional, que são então separados em gel de alta resolução.

O polimorfismo de AFLP depende da relação entre o número de nucleotídeos seletivos nos iniciadores da PCR e a complexidade do genoma, e resulta de mutações de ponto, inversões, deleções e inserções, que levam à perda ou ganho de sítios de restrições. Os marcadores AFLP são dominantes, tal como os marcadores RAPD, ou seja, não permitem distinguir se uma banda no gel é resultado da amplificação de um ou dois alelos, entretanto, bandas oriundas de indivíduo heterozigotos possuem metade da intensidade da banda do homozigoto.

O polimorfismo obtido com marcadores AFLP está baseado em diferenças entre os genótipos na distribuição dos sítios de restrição e na amplificação diferencial dos fragmentos. Assim, possui grande capacidade para detecção de variabilidade genética e uso em caracterização de cultivares. Tem sido utilizado com grande sucesso em estudos de diversidade genética em arroz (VIRK et al., 1998; ZHU et al., 1998).

Zhu et al. (1998) para investigar a distribuição de marcadores AFLP em genoma de arroz utilizaram 90 plantas de uma população F2 de retrocruzamento de subespécies indica e japônica (IR20 xIR63-13) e cinco combinações de iniciadores, sendo que cada iniciador gerou entre 80 a 115 fragmentos. Em geral, 20% dos fragmentos AFLP foram polimórficos. Os resultados sugerem que os marcadores AFLP não foram restringidos a nenhuma região do cromossomo em particular como centrômeros e telômeros. Em vez disso, os números e locações dos marcadores polimórficos gerados por diferentes combinações dos iniciadores foram ao acaso e variáveis. A observação que os marcadores AFLP mapearam ao longo de todo o genoma de arroz é de particular significância para estudos de biodiversidade e de caracterização da organização do germoplasma já que é sabido que a técnica AFLP gera marcadores nas regiões intermediárias dos cromossomos, onde há pouco material repetitivo.

Os autores observaram que as bandas AFLP tenderam a comportar-se semelhantemente quando as condições de reação variaram. Essa alta uniformidade de bandas AFLP pode detectar problemas com amostras individuais ou reações, reduzindo, então, a possibilidade de erros causados por variações na densidade das bandas. Isto dá a AFLP uma considerável vantagem sobre os métodos baseados em PCR.

2.4.14 SSCP (Polimorfismo de Conformação de Fita Simples)

Desenvolveu-se um método chamado SSCP- Polimorfismo de conformação de fita simples, que é uma estratégia para determinar polimorfismo a partir de um

segmento, com o objetivo de detectar mutações previamente desconhecidas. O método consiste na desnaturação de segmentos RAPD monomórfico, que são polimórficos a nível de seqüência interna. Ao resfriar a temperatura algumas fitas encontram fitas complementares originais, enquanto a maioria forma ponte de H com elas mesmas, resultando em conformação específica que será diferenciada no gel de eletroforese.

2.4.15 Aspectos Relevantes na Escolha da Técnica Molecular.

Vários aspectos devem ser considerados na escolha da técnica molecular a ser utilizada em uma determinada espécie. Dentre eles estão:

Que tipo de marcador utilizar?

Qual é o número mínimo de marcadores necessários para caracterizar um grupo de genótipos?

Quanto tempo será necessário para obter a caracterização?

Qual a disponibilidade financeira ?

As respostas para esses questionamentos dependem de um série de considerações. Em primeiro lugar, o nível de polimorfismo varia muito de uma espécie para outra. Em aveia hexaplóide, o nível de polimorfismo é relativamente alto, portanto um número menor de marcadores do tipo RFLP é suficiente para caracterização de cultivares (MILACH et al., 1997).

Em feijão, Duarte et al. (1999) avaliaram a diversidade genética de 27 cultivares de diferentes variedades utilizando a análise de RAPD. Foram utilizados 33 iniciadores que geraram 265 produtos amplificados, dentre esses somente 137 eram polimórficos. Esse número de fragmentos foi mais que suficiente para caracterização da diversidade genética. Os autores empregando a análise de Bootstrap mostraram que 50 bandas polimórficas já eram suficientes para produzirem um dendrograma com os mesmos agrupamentos gerados com os 137 marcadores usados.

O número de marcadores a serem amostrados é fundamental do ponto de vista de precisão das estimativas das distâncias genéticas. Da mesma forma esse aspecto deve ser considerado em termos de custo de análise. Cada marcador adicional amostrado resultará num custo extra. Portanto, em geral, a quantidade de iniciadores e de marcadores a serem usadas é determinada de maneira empírica, ou seja, é aquela que consegue diferenciar os indivíduos analisados (MILACH, 1998).

Nei e colaboradores (1983) recomendam a utilização de pelo menos 30 marcadores moleculares polimórficos para construção de árvores filogenéticas de elevada acurácia. Isto foi constatado por Hu e Quiros (1992) empregando a técnica de RAPD distinguiram 14 cultivares de brócolis e 12 de couve-flor usando 29 bandas polimórficas que foram reveladas por quatro iniciadores de seqüência arbitrária. Yi et al (1995) também conseguiram identificar as relações genéticas entre variedades selvagens e cultivadas de arroz usando 44 bandas polimórficas que foram geradas por quatro iniciadores.

O polimorfismo detectado para uma espécie varia bastante com o tipo de marcador utilizado. Por exemplo, em arroz, o número de locos polimórficos detectado por uma sonda de minissatélite é superior àquele obtido por iniciador de RAPD (YI et al., 1995).

Outro aspecto a considerar é quanto à consistência dos resultados obtidos. Indiscutivelmente os marcadores de RFLP são mais consistentes para serem utilizados em estudos de mapeamento comparativo. Já os marcadores AFLP e minissatélites são mais consistentes para serem usados em estudos de identificação de variedades e ou cultivares por revelarem um alto nível de polimorfismo (YI et al, 1995).

O tempo para caracterizar uma nova cultivar depende da técnica em si. Os marcadores moleculares identificados por amplificação, especialmente RAPDs, são mais fáceis de manipular, e em apenas um dia pode ser realizada a reação (dependendo do número de cultivares a serem analisados), além de terem menor custo. Embora apresentem resultados menos consistentes costumam ser mais utilizados em espécies onde ocorre um grau maior de polimorfismo. Os marcadores do tipo SCAR e do tipo STS são muito semelhantes quanto ao tempo de execução ao da técnica de RAPD, com a vantagem de serem mais consistentes e a desvantagem de envolverem o desenvolvimento de “iniciadores específicos”, o que eleva o custo. Porém, se os “iniciadores já estiverem disponíveis no mercado, o custo fica comparável ao RAPD. As técnicas de marcadores do tipo microssatélite e do tipo AFLP são mais elaboradas e custosas. Quanto ao tempo de execução AFLP leva de 2 a três dias e RFLP pode levar até três semanas. (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; MILACH, 1998).

2.4.16 Análise de Agrupamentos

A diversidade genética é, em geral, quantificada por análises estatísticas multivariadas, que permitem ao pesquisador um conhecimento adicional sobre os genótipos disponíveis. Entre as técnicas estatísticas multivariadas mais usadas encontra-se a análise pelos métodos aglomerativos ou agrupamentos, que tem por finalidade reunir as unidades amostrais por algum critério de classificação em vários grupos, de tal forma que exista homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre grupos (SNEATH E SOKAL, 1973). Além disso, as técnicas de análise de agrupamento têm por objetivo dividir um grupo original de observações em vários grupos homogêneos, segundo critérios de similaridade ou dissimilaridade (PERONI et al, 1990).

A Análise de Agrupamentos explora as similaridades entre indivíduos ou entre variáveis definindo-os em grupos, considerando simultaneamente, no primeiro caso, todas as variáveis medidas em cada indivíduo e, no segundo, todos os indivíduos nos quais foram feitas as mesmas mensurações. Segundo esse método, procura-se por agrupamentos homogêneos de itens representados por pontos num espaço dimensional em um número conveniente de grupos relacionando-os através de coeficientes de similaridades ou de semelhança.

A aplicação desta análise é controversa entre os pesquisadores, pois pouco se sabe a respeito das propriedades estatísticas dos seus vários métodos, e apenas testes limitados são conhecidos para verificar a significância dos resultados. Como existem à disposição vários métodos para a análise de agrupamentos, portanto o pesquisador deve levar em consideração que o melhor método é aquele que fornece os resultados mais coerentes com a realidade em estudo.

Jackson e colaboradores (1989) relataram que o emprego destes métodos pode revelar alguns problemas. Geralmente, a natureza objetiva das análises é comprometida pela escolha subjetiva do método de agrupamento e/ou do coeficiente de similaridade empregado. Diversos coeficientes são sugeridos para o uso com os marcadores moleculares do tipo de RAPD (ALFENAS, 1998; DUARTE et al.,1999). Os coeficientes empregam diversas razões da similaridade ou de diferenças por comparações totais, e seus valores variam de 0 a 1 (SKROCH et al., 1992). Embora os coeficientes estejam disponíveis, os estudos publicados não indicam uma preferência por nenhum, uma vez que os resultados do agrupamento e ordenamento podem sofrer influência dependendo da escolha do coeficiente. Os coeficientes de similaridade necessitam ser mais bem compreendido, de modo que, os mais eficientes possam ser empregados (JACKSON et al., 1989).

Os diversos métodos para a análise de agrupamentos podem ser enquadrados em dois tipos principais (ALFENAS, 1998):

a) Métodos de otimização: Entre esses se destacam: (i) os métodos de partição que procuram classificar regiões no espaço, definidas em função de variáveis, que sejam densamente observadas em termos de observações daquelas com ocupação mais rara; (ii) os métodos com origem arbitrária que procuram classificar as observações segundo conjuntos previamente definidos que servirão como centróides iniciais, a partir dos quais as observações irão se agrupando, por similaridade, para formar agrupamentos; (iii) os métodos por similaridade mútua que procuram agrupar observações que tenham uma similaridade comum com outras observações.

b) Métodos por agrupamentos hierárquicos: São as técnicas mais comumente usadas em estudos de diversidade biológica. Para o seu desenvolvimento parte-se de uma matriz simétrica de coeficientes de associação entre itens e da combinação dos mesmos, segundo níveis hierárquicos de similaridade. É utilizado um procedimento aglomerativo, de tal modo, que cada ciclo de agrupamento obedeça a uma ordem sucessiva no sentido do decréscimo de similaridade. Embora diversas medidas de similaridade tenham sido propostas, somente duas são geralmente usadas: coeficiente de correlação e coeficiente de distância. Se as variáveis forem padronizadas a partir da matriz inicial de dados, dando o mesmo peso a cada uma delas, qualquer um desses coeficientes poderá ser diretamente transformado no outro.

A análise de agrupamentos hierárquicos é determinada a partir de uma matriz inicial de dados na qual são feitas as comparações utilizando-se um coeficiente de similaridade.

A matriz inicial de coeficientes de similaridade representa o grau de semelhança entre pares de indivíduos, i e j , com o maior nível de similaridade dentro de um grupo, ij . O grupo combinado age como se fosse um único indivíduo que é arranjado de acordo com os respectivos graus de similaridade de modo a ficarem agrupados segundo uma disposição hierárquica.

Os resultados quando organizados em gráfico, mostram as relações das amostras agrupadas. A forma gráfica mais usada para representar o agrupamento hierárquico é o dendrograma. Como este gráfico é uma simplificação em duas dimensões de uma relação n -dimensional é inevitável o aparecimento de algumas distorções em relação à similaridade. A medida de tal distorção pode ser obtida por um coeficiente de correlação, dito "cofenético", entre os valores da matriz inicial de similaridade e aqueles derivados do dendrograma.

Existem vários métodos de agrupamentos, e o mais comumente usado é o Método das Médias das Distâncias - UPGMA. No método UPGMA para cada agrupamento é dado um peso proporcional ao número de objetos que o constitui, de tal modo que a incorporação de um novo elemento a um grupo baseia-se no nível médio de similaridade desse elemento com todos os que fazem parte do grupo.

Métodos de agrupamento hierárquico podem ser implementados facilmente e têm uma vantagem relativa sobre o agrupamento baseado em matriz, isto é, eles têm flexibilidade para incorporar outros dados além da matriz de incidência binária. Uma desvantagem é que o pesquisador deve decidir sobre um nível de similaridade apropriado para selecionar os grupos. Em certas situações isto não é problema desde que o pesquisador avalie o resultado produzido. Entretanto, em situações onde essa avaliação é impossibilitada, outros métodos devem ser empregados.

2.4.17 Coeficientes de Similaridades

A finalidade de um coeficiente de similaridade é representar a relação linear entre dois indivíduos, i e j , avaliada por um conjunto comum de variáveis, ou seja, expressa a proporção de caracteres que dois indivíduos possuem mutuamente quando comparados com o número total de variáveis possuídas por um ou pelo outro, ou por ambos indivíduos avaliados (ALFENAS, 1998).

Em geral, os coeficientes de similaridades são calculados a partir de variáveis binárias, com valores de 0 e 1, representando ausência ou presença, respectivamente. Por conseguinte, a comparação de dois indivíduos - que poderia ser populações, cultivares, variedades, espécies, etc...- se dá pela construção de uma matriz, utilizando-se, por exemplo, a frequência de bandas observadas no gel de eletroforese. Vale mencionar que tem sido de praxe considerar somente as bandas que apresentam constância e nitidez nos géis (ALFENAS, 1998).

Segundo Alfenas (1998) existem vários coeficientes de similaridade propostos na literatura. São tantos que o autor adverte que a escolha de um determinado coeficiente de similaridade é função dos objetivos propostos na pesquisa, do tipo de indivíduos estudados e do grau de semelhança entre eles, pois cada coeficiente tem propriedades inerentes que podem afetar a comparação de acordo com o grau de semelhança entre os indivíduos avaliados no estudo de diversidade genética.

2.5 MATERIAL E MÉTODOS

2.5.1 Material Vegetal

A análise de DNA polimórfico amplificado ao acaso (RAPD) foi utilizada para estudar a diversidade genética de 16 variedades de arroz. Foram estudadas 12 variedades adaptadas ao sistema de cultivo de sequeiro consideradas “variedades locais” do Estado do Maranhão - Brasil: Lageado, Dobradinho, Agulha, Arroz de Revenda, Goiano, Ligeiro Vermelho, Bico Ganga, Comum Branco, Zebu Branco, Cana Roxa, Sagrimão, Ligeiro, e 4 variedades melhoradas que foram utilizadas como referência, sendo três variedades melhoradas pelo Instituto Agrônomo de Campinas – SP, Brasil: IAC 47, IAC 25, IAC 1278 e uma melhorada pelo IRRI International Rice Reserch Institute – Filipinas: IR-08. Dentre as variedades melhoradas, duas foram melhoradas para o sistema de cultivo irrigado, IAC-1278 e IR-08.

Vale salientar que a escolha desse conjunto de variedades foi baseada em pesquisas realizadas pelo Departamento de Solos – Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas - com variedades de arroz que aparentemente sofreram um processo intenso de adaptação às condições do Estado do Maranhão. Essas plantas mostraram grande variabilidade quanto à sua capacidade de acumular proteínas de reserva no grão e tolerância à Al^{+++} tóxico (Tabela 1).

Tabela 1. Variedades de arroz que foram utilizadas no experimento e suas características fenotípicas.

Controle CNPAP/EMBRAPA	Variedades	Eficiência de uso de N (PG/NT) ¹	% PB no Grão ²	Tol. Al^{3+} ⁽³⁾
CA790001	Lageado	58,68	5,7	Sensível
CA790054	Dobradinho	48,72	7,9	Sensível
CA790057	Agulha	52,19	7,0	Med. Tol.
CA790088	Revenda	61,64	7,4	Med. Sens.
CA790033	Goiano	39,98	8,3	Tolerante
CA790052	Ligeiro Vermelho	54,25	8,2	Med. Sens.
CA790138	Sagrimão	21,39	8,8	Med. Tol.
CA790156	Cana Roxa	63,14	6,3	Med. Tol
CA790180	Bico Ganga	49,70	7,3	Med. Tol
CA790121	Zebu Branco	40,36	8,2	Med. Tol
CA790102	Ligeiro Branco	N.D.	N.D.	Med. Sens.
CA790160	Comum Branco	N.D.	N.D.	Tolerante
-	IAC 47	52,39 ^{abcde}	8,2	Sensível
-	IAC 1278	66,54 ^a	6,2	Sensível
-	IAC 25	N.D.	N.D.	N.D.
-	Filipinas IR-08	N.D.	N.D.	N.D.

¹ PG = Produção de grãos em g/planta; NT = N Total da Parte aérea + grãos em g/planta (Ferraz Jr. et al., 1997)

² PB= Proteína Bruta no grão, sem suplemento de N foliar, Ferraz Jr, 1992.

³ Med.Sem.= Medianamente sensível; Med.Tol.= Medianamente Tolerante; Mendonça, 1991.

⁴ N.D.=Não determinado

Pelo exposto na Tabela 1, observa-se que a maioria das variedades escolhidas tem grande variabilidade quanto à sua capacidade de acumular proteínas de reserva no grão (FERRAZ Jr. et al., 1997) e tolerância a Al^{+++} tóxico (MENDONÇA, 1991).

2.5.2 Otimização das Condições de Reação para Extração de DNA

Na fase inicial desse trabalho, foi necessário adequar a metodologia proposta na literatura, sendo preciso otimizar o método de extração às condições a serem utilizadas no experimento, a fim de evitar erros sistemáticos e assegurar a obtenção de amostras de DNA uniformes, puras e com o mínimo de contaminação para serem usadas na análise RAPD.

Com o objetivo de avaliar a quantidade ideal de tecido adequada para a extração de DNA em arroz de acordo com os protocolos propostos por Ferreira & Grattapaglia (1995) e Virk et al. (1995), pesaram-se amostras de 10, 25, 50, 100 e 150 mg de tecido vegetal fresco, coletando-se tecido do terço médio de folhas jovens de arroz com 23 dias de idade, onde os tecidos estão em intensa divisão celular, de acordo com o seu estágio de desenvolvimento. As folhas foram cortadas em tiras finas de aproximadamente 3 mm de largura, colocadas em tubos de 1,5 ml, e em seguida os tubos foram colocados numa caixa de isopor contendo N₂ líquido. Macerou-se o tecido com um pilão de plástico duro dentro do próprio tubo.

Ao tecido macerado adicionou-se 700 µl de tampão de extração CTAB (anexo 1), e ressuspendeu-se o tecido no tampão com uma breve agitação em Vortex. Incubou-se os tubos em banho-maria a uma temperatura de 65°C por 60 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Adicionou-se 600 µl de solvente orgânico (clorofôrmio-álcool isoamílico 24:1), verteu-se os tubos 20 vezes e em seguida procedeu-se a centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm.

A partir desta fase do protocolo separaram-se as amostras em dois grupos com o objetivo de se testar a eliminação da segunda lavagem com CTAB 10% + 1.4M NaCl e extração com solvente orgânico (clorofôrmio-álcool isoamílico 24:1) proposta no protocolo de Ferreira & Grattapaglia (1995) que tinha por objetivo melhorar a qualidade do DNA extraído.

Portanto, somente no segundo grupo, adicionou-se à fase aquosa 50 µl de CTAB 10% + 1.4M NaCl, homogeneizando a solução e adicionou-se 600 µl de solvente orgânico (clorofôrmio-álcool isoamílico 24:1), verteu-se os tubos 20 vezes e em seguidas centrifugou-os por 5 minutos a 13000 rpm. Pipetou-se a fase superior formada para outro tubo tomando cuidado para não haver possíveis contaminações com a fase orgânica inferior.

A partir desta fase do protocolo, nos dois grupos foram efetuados os mesmos tratamentos nos dois grupos. Adicionou-se 400 µl de isopropanol à frio (-20 °C) para precipitar o DNA, vertaram-se os tubos 20 vezes, os quais foram colocados à -20 °C por 1 noite (14 horas). Em seguida foi efetuado uma centrifugação por 3 minutos a 7000 rpm, para formar o precipitado que foi lavado duas vezes com etanol 70% durante 10 minutos cada. Depois lavou-se o precipitado uma vez com etanol 95%, durante 5 minutos. Secou-se o precipitado em centrifuga a vácuo por 20 minutos. Ressuspendeu-se o precipitado em 25 µl de tampão TE com 0,25 µg/ml de RNase. Incubou-se a 37 °C por 60 minutos.

A qualidade da extração e possíveis contaminações foram avaliadas após corrida eletroforética em gel agarose (1%) em TBE. Foram colocadas no gel quantidades conhecidas de DNA padrão do fago Lambda e 2µl da solução das amostras de DNA extraído com 2µl de corante. A corrida foi conduzida a voltagem constante de 80 Volts por aproximadamente 80 minutos. O gel foi retirado da cuba de eletroforese, mantido durante 5 minutos imerso numa solução com brometo de etídeo e, em seguida foi lavado em água durante 30 minutos para retirar o excesso de corante. Após a lavagem o gel foi visualizado sobre um transluminador de luz ultra violeta.

2.5.3 Protocolo Utilizado Após Otimização de Extração de DNA Total

O protocolo para extração de DNA total (DNA genômico + mitocondrial + cloroplasto) foi adaptado a partir de Ferreira & Grattapaglia (1995) e Virk et al. (1995):

- a. Pesou-se amostras de 20 a 30 mg de tecido vegetal fresco, coletando-se tecido do terço médio de folhas jovens de arroz com 23 dias de idade;
- b. Cortou-se as folhas em tiras finas de aproximadamente 3 mm de largura, e colocando-as em tubos de 1,5 ml, que foram colocados numa caixa de isopor contendo N₂ líquido;
- c. Macerou-se o tecido com um pilão de plástico duro dentro do próprio tubo. O tecido ficou permanentemente congelado durante todo o processo;
- d. Ao tecido macerado, adicionou-se 700 µl de tampão de extração CTAB (anexo 1), ressuspendendo-o no tampão com uma breve agitação com o auxílio de Vortex,
- e. Incubou-se os tubos em banho-maria a uma temperatura de 65°C por 60 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Adicionou-se 600 µl de solvente orgânico (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1), verteu-se os tubos 20 vezes e em seguida procedeu-se centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm;
- f. Pipetou-se a fase líquida superior formada para outro tubo com cuidado, evitando-se possíveis contaminações com a fase orgânica inferior;
- g. Adicionou-se 400 µl de isopropanol a frio (-20 °C) para precipitar o DNA. Os tubos foram vertidos 20 vezes e mantidos à -20 °C por 1 noite (14 horas);
- h. Procedeu-se a centrifugação por 3 minutos a 7000 rpm, para formar o precipitado. Em seguida, lavou-se o precipitado duas vezes com etanol (70%) durante 10 minutos;
- i. Lavou-se o precipitado uma vez com etanol (95%), durante 5 minutos, após esta lavagem, secou-se o precipitado em centrifuga a vácuo por 20 minutos;
- j. Ressuspendeu-se o precipitado em 25 µl de tampão TE com 0,25 µg/ml de RNase. Incubou-se a 37 °C por 60 minutos;
- k. A amostra foi submetida a eletroforese em gel de agarose (1%). A corrida foi conduzida a voltagem constante de 80 Volts por aproximadamente 80 minutos. O gel foi retirado da cuba de eletroforese permanecendo 5 minutos imerso numa solução com brometo de etídeo e 30 minutos em água para retirar o excesso de corante;
- l. A visualização do Gel foi feita em um transluminador de luz ultra violeta.

Observação: Para todas as variedades, foi feito um controle negativo (presença de todos reagentes menos o DNA molde), para detectar problemas de contaminação. A Eletroforese dos controles foi realizada em géis separados das amostras.

2.5.4 Quantificação do DNA Extraído

A quantificação de DNA é uma etapa fundamental para eficiência da reação de amplificação. Uma boa estimativa da concentração de DNA permite o cálculo do volume final do mesmo na reação de PCR, nas quantidades adequadas recomendadas nos protocolos.

Para quantificar o DNA extraído das amostras de arroz, utilizou-se o método da quantificação comparativa em gel de eletroforese de agarose corado com brometo de etídeo (MILACH, 1998). Como marcador de DNA foi usado o fago Lambda /HIND III

da Promega Product Information, como controle, que apresenta as bandas descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Bandas apresentadas pelo marcador de DNA fago Lambda /HIND III

DNA de Lambda como controle			
Controle	Concentração [0,015 µg/ ul]	Quantidade de DNA (ng)	Bandas (pb)
1	0,045	450,0	47.813
2	0,0217	217,7	23.130
3	0,0088	88,6	9.416
4	0,0061	61,7	6.557

Preparou-se uma solução estoque que continha a concentração de 0,015 µg/µl, tamanho do DNA do fago Lambda /HIND III.

Preparou-se as amostras de DNA de arroz a serem quantificadas com 2 µl de corante Blue Juice e procedeu-se a corrida eletroforética em gel de agarose (1%). Durante a corrida, o gel foi mantido imerso em solução tampão TBE 1X. A corrida foi conduzida a voltagem constante de 80 Volts por aproximadamente 80 minutos. O gel foi retirado da cuba de eletroforese e ficou 5 minutos imerso numa solução com 4µg/ul de brometo de etídeo e imerso por 30 minutos em água para retirar o excesso de corante. A visualização do DNA foi feita em um transiluminador de luz ultravioleta. O gel fotografado com câmara Polaroid.

Observou-se a intensidade das bandas formadas pelo DNA extraído das variedades de arroz em relação a intensidade das bandas formadas pelas concentrações padrões do marcador Lambda. A análise visual mostrou que as amostras eram semelhantes com a concentração de 200 ng de DNA do marcador Lambda.

2.5.5 Otimização do Ensaio RAPD

Tendo em vista a sensibilidade da técnica PCR-RAPD, foi necessária a execução de vários ensaios para o estabelecimento de um protocolo que permitisse reproducibilidade dos resultados. A confirmação da aplicação do protocolo usando combinações diferentes de amostras e iniciadores e a consistência dos resultados obtidos através de sua reproducibilidade são de suma importância para a análise RAPD.

Para otimizar o ensaio RAPD para o DNA genômico de arroz, foram examinados os efeitos dos diversos parâmetros: Concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores, a concentração do DNA molde, a concentrações de sais, e dos nucleotídeos, temperatura e duração dos ciclos de acordo com os protocolos de Caetano-Anolles, 1993, Virk et al., 1995, 1996 e 1998.).

2.5.6 Ensaio RAPD

A seguir transcrevem-se os parâmetros testados nos ensaios de otimização de RAPD:

Parâmetro	Concentração Testada
a) oligonucleotídeos iniciadores	a) 0.2 µM b) 0.4 µM
b) DNA extraído das variedades de arroz	a) 5 ng b) 10 ng

- | | |
|-------------------------------------|--|
| c) dNTP | a) 200 μ M |
| d) íon Mg ($MgCl_2$) | a) 1.5 mM
b) 2,25 mM |
| e) Enzima Taq-Polimerase | a) 0.5 μ M
b) 1.0 μ M |
| f) Temperatura e o tempo dos ciclos | a) 45 ciclos
aquecimento inicial de cinco minutos a 94°C, seguido de 45 ciclos de trinta segundos a 94°C, um minuto a 35°C e dois minutos a 72°C e, a seguir, cinco minutos a 72°C

b) 49 ciclos
49 ciclos de trinta segundos a 94°C, um minuto a 37°C e um minuto a 72°C e, a seguir, sete minutos a 72°C |

2.5.7 Análises dos Dados

O estudo da diversidade genética foi feito através de análise multivariada com o programa NTSys (ROHLF, 1992). Para o cálculo do coeficiente de similaridade foram testados os coeficientes Nei & Li, Jaccard, Ochiai, Russel & Rao, Simple Matching e Rogers & Tanimoto para gerar matrizes de similaridade (Tabela 3), computando os fragmentos monomórficos e polimórficos e assumindo que os produtos de mobilidade eletroforética diferentes são não alélicos e de mobilidade semelhante são alélicos. As comparações entre eles foram realizadas pela avaliação dos dendrogramas gerados pelo algoritmo UPGMA (método das médias das distâncias genéticas) e pelas correlações de Spearman entre os coeficientes de similaridade genética (SAEG, 2000).

Cada variedade foi considerada como uma unidade taxonômica operacional (OTU). A comparação dos dendrogramas foi feita subjetivamente usando a inspeção visual, e então contrastados com árvores de consenso usando o deslocamento, obtido das comparações de todo o par das combinações de dendrogramas (ROHLF, 1982). O deslocamento predeterminado é uma estimativa relativa da similaridade entre dendrogramas e foi obtido dividindo-se o número de ramificação comuns entre os dendrogramas pelo número possível máximo de ramificações, que é $n-2$ para dendrogramas integralmente resolvidos (n corresponde ao número de OTU) (ROHLF, 1982).

Tabela 3. Coeficientes de similaridade estudados.

Coeficientes de Similaridade	Equação de Expressão	Fonte
1. Nei & Li	$\frac{2a}{a+b+c}$	Dice, 1945; Nei & Li, 1979
2. Jaccard	$\frac{a}{a+b+c}$	Jaccard, 1901
3. Ochiai (O)	$\frac{a}{((a+b)(a+c))^{1/2}}$	Ochiai, 1957
4. Russel & Rao (RR)	$\frac{a}{a+b+c+d}$	Russel & Rao, 1940
5. Simple Matching (MS)	$\frac{a+d}{a+b+c+d}$	Sokal & Michener, 1958.
6. Roger & Tanimoto (RT)	$\frac{a+d}{a+2b+2c+d}$	Roger & Tanimoto, 1960

1 = presença e 0 = ausência de banda gerada pela técnica RAPD: a = 1,1; b = 1,0; c = 0,1; d = 0,0

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.6.1. Otimização das Condições de Reação para Extração de DNA

a) Ajuste da quantidade de material vegetal de arroz para extração de DNA

A eletroforese mostrou que visualmente não houve diferença entre as amostras que receberam e as que não receberam a segunda lavagem com CTAB 10% + 1.4M NaCl e extração com solvente orgânico (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1). A possibilidade de eliminar estas etapas para a extração de DNA é fundamental, pois representa uma redução de custo e tempo de análise. Apesar de poucos protocolos fazerem uso dessa etapa para eliminação de resíduos de folhas e outras impurezas, ela é importante quando o tecido vegetal contém grandes quantidades de polipeptídeos, tais como mandioca e aveia, por exemplo (MILACK, 1998).

Observou-se a inviabilidade de usar quantidades superiores a 100 mg de tecido foliar para esse protocolo, já que essa quantidade resultou na extração de DNA de baixa qualidade. O excesso de material vegetal dificultou o maceramento e homogeneização. Usando-se este protocolo, a quantidade ideal está entre 25 e 50 mg de tecido vegetal.

Foram realizados outros testes para determinar com mais precisão a quantidade de tecido para a extração de DNA em arroz, utilizando-se amostras de 10, 20, 30, 40 e 50 mg de tecido vegetal fresco. Foram coletados tecido do terço médio de folhas jovens de arroz com 23 dias de idade.

A análise dos géis após eletroforese das amostras dos testes de extração de DNA em relação à quantidade testada de tecido vegetal verificou-se que a extração a partir de 10 mg de tecido de folha produziu bandas muito fracas, indicando pouca quantidade de DNA extraído. As amostras de 20 e 30 mg apresentaram bandas nítidas, diferenciando de pouco quanto à intensidade. Observou-se também que essas quantidades proporcionaram resultados com alta reproducibilidade (Figura 1).

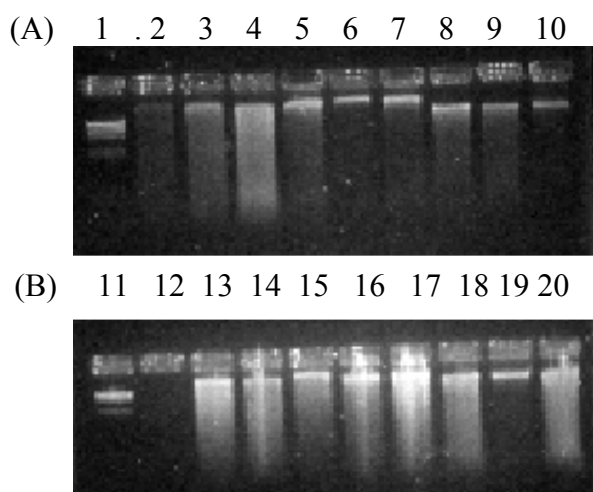


Figura 1. 1- Extração de DNA utilizando marcador Lambda1 amplificação randômica de DNA usando iniciador OPE – 19 (5'ACGGCGTATG3') de variedades de arroz : (A) Amostras de 20 mg de tecido de folha (B) amostras de 30 mg de tecido de folha : 1, 11- marcador λ 174; 2, 12- Lageado; 3, 13- Bico Ganga, 4,14- Zebu Branco; 5,15- Ligeiro Vermelho; 6,16- Goiano; 7,17- Comum Branco; 8,18- Dobradinho; 9,19-Arroz de Revenda; 10,20- Cana Roxa.

b) Ajuste da metodologia para purificação do DNA extraído

Como pode ser observada na Figura 1, a extração de DNA resultou na presença de um arraste de material, após eletroforese, o que sugere a presença de degradação do DNA amostrado. A presença de arraste de fragmento no gel indica que o DNA não é de boa qualidade, o que certamente interferirá de forma negativa na etapa de amplificação. Por esta razão, foram realizados novos testes com o objetivo de verificar qual(is) etapa(s) da extração estava afetando a pureza e integridade do DNA extraído. As etapas testadas foram a maceração inicial e a lavagem com tampão CTAB e clorofórmio + álcool isoamílico (24:1).

Analisando os resultados dos testes, observou-se que as extrações feitas utilizando uma segunda lavagem com clorofórmio + álcool isoamílico (24:1) juntamente com as que foram submetidas a segunda lavagem com CTAB 10% + 1.4M NaCl não apresentaram diferença significativa, sendo a eficiência de extração igual ao tratamento sem a lavagem com CTAB 10% + 1.4M NaCl e sem a segunda lavagem com clorofórmio + álcool isoamílico (24:1).

Outro teste foi realizado de modo a averiguar se o terço médio da folha que estava sendo usado, poderia estar influenciando nos resultados. A folha foi, então, dividida em 3 partes: terço inferior (base foliar), terço médio e terço superior (ápice foliar). Não foram encontradas diferenças na quantidade ou qualidade do DNA dependendo da parte da folha utilizada.

Foi testada também a etapa de maceração tendo como critério único manter as amostras congeladas por todo o período. Os resultados mostraram que a maceração realizada nas amostras imersas em N-líquido, resultou na eliminação dos arrastes provocados pela quebra de DNA e possíveis contaminações com polissacarídeos. A maceração inicial mostrou ser a etapa mais importante da extração, pois sendo bem feita elimina a necessidade de lavagens extras que visam melhorar a purificação do DNA extraído (Figura 2).

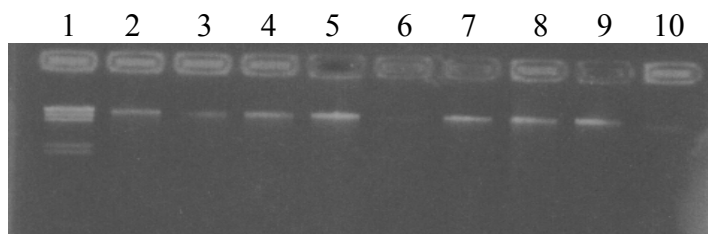


Figura 2. DNA extraído de variedades de arroz após otimização dos procedimentos de extração de DNA.

2.6.2 Otimização da Amplificação de DNA Amostrado de 16 Variedades de Arroz.

Para determinar a condição ótima de reação para a amplificação de DNA, foram testados os efeitos de diferentes concentrações de DNA (Figura 2), magnésio, iniciador (Figura 3) e Taq-polimerase sobre a reproducibilidade dos produtos amplificados. A reproducibilidade do padrão de bandejamento do RAPD é pré-requisito para o uso dos dados para a análise de variabilidade e diversidade genética entre populações. A reproducibilidade do ensaio RAPD foi determinada pela repetição de PCRs em diferentes ocasiões. Os resultados, em comum com outros relatados em um grande número de trabalhos (VIRK et al., 1995; KOKAEVA et al., 1998; LANZA et al., 1997; VIERLING & NGUYEN, 1992) demonstraram que, usando uma combinação específica

de DNA e concentração de iniciador, resultados reproduzíveis são obtidos usando um protocolo previamente otimizado.

De acordo com os resultados obtidos, a especificidade e reproducibilidade do padrão de bandamento foram obtidas nas concentrações de 5 ng e 10ng de DNA (Figura 3) ; 0,2-0,4 μ M de iniciador (Figura 4); 2.2 μ M de cloreto de magnésio e 1 unidade de Taq-polimerase. Esses resultados foram semelhantes aos relatados por Yi et al. (1998) e Virk et al. (1995) que obtiveram resultados de reproducibilidade com concentrações parecidas às verificadas nesse trabalho. Entretanto, Devos e Gale (1992) obtiveram resultados de reproducibilidade usando concentrações mais baixas de magnésio, dNTPs e Taq polimerase.

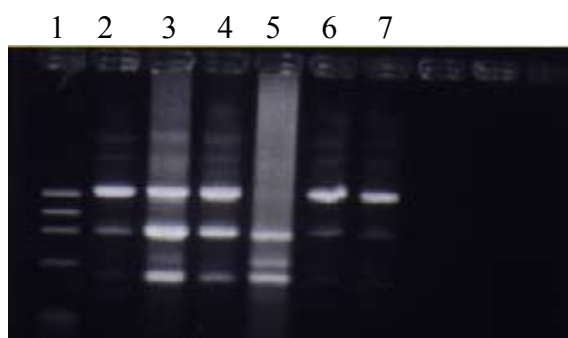


Figura 3. Efeito da concentração de DNA extraído de 03 variedades de arroz sobre a amplificação randômica de DNA usando iniciador OPE – 06 (5'AAGACCCCTC3'). Todas as reações foram conduzidas na temperatura de anelamento de 35°C por 1 minuto, com idêntica concentrações de iniciador (0.4 μ M), magnésio (2.2mM) e Taq polimerase (1 unidade). Foram testadas duas concentrações de DNA, 5 ng (2,3,4) e 10 ng (5,6,7).

Neste trabalho, os resultados dos quatro iniciadores utilizados (OPE-05, OPE-07, OPE-09, OPE-11) só apresentaram reproducibilidade quando a concentração dos iniciadores foi aumentada de 0,4 para 0,8 μ M.

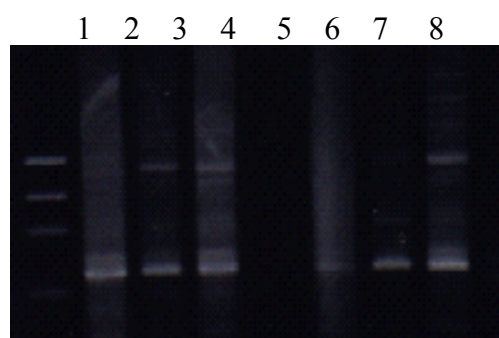


Figura 4. Efeito da concentração de Iniciador (OPE-18 5'GGACTGCAGA3'). Todas as reações foram conduzidas na temperatura de anelamento de 35°C por 1 minuto, com idêntica concentrações de DNA (5 ng), magnésio (2.2mM) e Taq polimerase (1 unidade). Foram testadas duas concentrações de iniciador, 0.4 μ M (2,3,4) e 0.2 μ M (6,7,8).

Em adição aos vários fatores que afetam a reproducibilidade do ensaio RAPD, nesse estudo estabeleceu-se que diferentes concentrações de iniciadores e que certos iniciadores produziram padrão de bandas mais nítido contendo mais informações quando usado em altas concentrações; isso ocorre provavelmente porque o DNA

genômico usado como alvo mantém sítios anelados, e portanto a concentração efetiva desses iniciadores para a amplificação foi baixa na reação do tubo (Virk et al., 1995).

O padrão de bandeamento não foi mantido usando o iniciador OPE – 13 em diferentes ocasiões, portanto os dados gerados desse iniciador não foram considerados na análise, por causa da baixa reprodutibilidade. O mesmo fato foi observado por Virk et al., 1995, com relação a reprodutibilidade dos resultados quando usaram o iniciador OPE-08.

2.6.3 Polimorfismo

Vinte decanucleotídeos de seqüência arbitrária (Tabela 1) foram usados para iniciar a amplificação de seqüências de DNA de 16 variedades de arroz.

Os iniciadores OPE-01, OPE-02, OPE-04 e OPE-08 não amplificaram o DNA das variedades usada nesse estudo (Tabela 2). Os 15 iniciadores remanescentes produziram 91 bandas marcadoras das quais 90 foram polimórficas. O número de bandas polimórficas variou entre 1 a 12 por iniciador e os tamanhos dos fragmentos amplificados variaram entre 300 e 2200 bp.

O nível de polimorfismo dentro das variedades de arroz foi bastante alto, com uma média de bandas polimórficas por iniciador de 4,6, em comparação com outras espécies onde a freqüência de polimorfismo encontrada em ensaios, tem sido, em média de 0,3 por iniciador em *Arabidops thaliana*, 0,5 em soja, 1,0 em milho e 2,5 em *Neurospora crassa*.

Tabela 4. Códigos e seqüências dos Iniciadores usados e número de fragmentos amplificados de 16 variedades de arroz.

Iniciador	Seqüência (5' – 3')	Números de fragmentos amplicados		
		Monomórfico	Polimórficos	Total
OPE- 01	CCCAAGGTCC	0	0	0
OPE- 02	GGTGCGGGAA	0	0	0
OPE- 03	CCAGATGCAC	0	5	5
OPE- 04	GTGACATGCC	0	0	0
OPE- 05	TCAGGGAGGT	0	6	6
OPE- 06	AAGACCCCTC	0	6	6
OPE- 07	AGATGCAGCC	0	7	7
OPE- 08	TCACCACGGT	0	0	0
OPE- 09	CTTCACCCGA	0	6	6
OPE- 10	CACCAGGTGA	0	1	1
OPE- 11	GAGTCTCAGG	0	5	5
OPE- 12	TTATCGCCCC	0	4	4
OPE- 13	CCCGATTCCG	0	0	0
OPE- 14	TGCGGCTGAG	0	4	4
OPE- 15	ACGCACAACC	1	4	5
OPE- 16	GGTGACTGTG	0	3	3
OPE- 17	CTACTGCCGT	0	12	12
OPE- 18	GGA CTGCAGA	0	9	9
OPE- 19	ACGGCGTATG	0	10	10
OPE-20	AACGGTGACC	0	8	8
	Total	1	90	91
	Percentagem	1%	99%	100%

Nei e colaboradores (1983) recomendam a utilização de pelo menos 30 marcadores polimórficos para construção de árvores filogenéticas de elevada acurácia. Isto foi constatado por Hu e Quiros (1992 ou 1991) que relataram que 14 cultivares de

brócolos e 12 de couve-flor puderam ser distinguidos usando-se 29 bandas polimórficas que foram determinadas por quatro iniciadores. Yi et al. (1995) também conseguiram demonstrar as relações genéticas entre variedades selvagens e cultivadas de arroz usando 44 bandas polimórficas que foram geradas por quatro iniciadores.

Diferenças entre as variedades de arroz foram observadas usando RAPD com 15 dos 20 iniciadores testados. O benefício desse estudo inicial foi a identificação de iniciadores que foram igualmente eficientes na análise da diversidade do germoplasma de arroz. Os iniciadores do kit Operon E - OPE-07, 17, 18, 19 e 20, todos produziram de sete a doze bandas polimórficas quando usados para a amplificação do DNA de arroz, no presente trabalho.

A seleção do iniciador é muito importante para se comparar genomas por meio de RAPD. Nesse estudo, os iniciadores mostraram ser bastante informativo, isto é, produziram vários fragmentos polimórficos. Além disso, quatro iniciadores mostraram ser cultivar-específicos (iniciadores OPE-7, OPE-9, OPE-12 e OPE-18), pois foram capazes de iniciarem a amplificação somente do DNA amostrado das variedades locais, sendo todas as bandas produzidas polimórficas. Kokaeva et al. (1998) estudando polimorfismo de cultivares, linhagens e mutantes de ervilha, com marcadores RAPD, detectaram dois iniciadores cultivar-específicos, C-09 e F-12, que só eram capazes de iniciar a amplificação nos cultivares Neosypajushyisa e Uzkobobovyi, respectivamente.

Segundo Kokaeva et al. (1998), considera-se um iniciador cultivar-específico quando ele é capaz de discriminar um grupo, pois somente amplificando o DNA desse grupo, não importando se o grupo é formado por espécies, variedades, populações ou cultivares.

Aagaard et al (1998) estudando o nível de diversidade entre e dentro de 6 populações de *pseudotsuga menziesii*, com marcadores RAPD, detectaram dois iniciadores raça-específicos. Eles detectaram também diferenciação racial dentro das populações estudadas. Todos as variedades de arroz mostraram fragmentos RAPD específicos, que diferenciam quanto ao número e tamanhos dos amplificadas, o que gerou uma expressão específica para o padrão de bandas – ‘impressão digital’ (Figura 5). Esses fragmentos são usados como marcadores RAPD no estudo de diversidade.

Para quantificar o polimorfismo RAPD e determinar a taxa de divergência entre as variedades de arroz, os dados obtidos foram compilados numa matriz de caracteres binários, em que a presença e ausência de fragmentos de mesmo tamanho e intensidade foram estimados como 1 e 0, respectivamente (Quadro 1). Como recomenda a literatura em uma análise típica de RAPD, as bandas pequenas e com baixa intensidade foram registradas como ausente, ou seja, foram representadas pelo caráter 0.

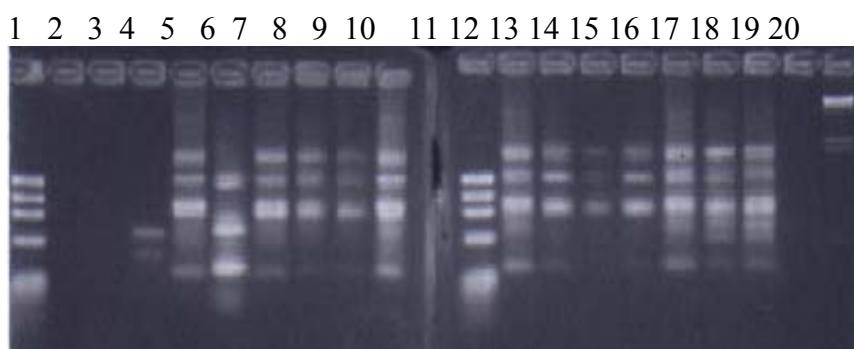


Figura 5. Amplificação randômica de DNA usando iniciador OPE – 19 (5'ACGGCGTATG3') de variedades de arroz: 1,11- marcador λ 174; 2- Lageado; 3- Bico Ganga, 4, Zebu Branco; 5- Ligeiro Vermelho; 6- Goiano; 7- Comum Branco; 8- Dobradinho; 9-Arroz de Revenda; 10- Cana Roxa; 11- Ligeiro, 12- Sagrimão; 13- Agulha; 14- IAC-47; 15- IAC25; 16- IAC1278; 17,18-IR-07; 19 - Vazio; 20- marcador Lambda.

Iniciadores	OPE-03					OPE-05					OPE-06					
Variedades	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Lageado	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Bico Ganga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Zebu Branco	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
L. Vermelho	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Goiano	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Comum Bran	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Dobradinho	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Revenda	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1
Cana Roxa	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1
Ligeiro	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Sagrimao	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1
Agulha	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
IAC-47	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1
IAC-25	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
IAC-1278	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
IR-08	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0

Quadro 1. Matriz gerada por ausência (0) e presença (1) de bandas geradas por 15 iniciadores de seqüência arbitrária aplicados no método RAPD para variedades de arroz.

Iniciadores	6	OPE-07								OPE-09						p-10
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
Lageado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Bico Ganga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
Zebu Branco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L. Vermelho	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Goiano	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Comum Bran	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	
Dobradinho	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
Revenda	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	
Cana Roxa	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	
Ligeiro	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	
Sagrimao	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	
Agulha	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
IAC-47	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	
IAC-25	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	
IAC-1278	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
IR-08	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

	OPE - 11					OPE - 12					OPE-14				OPE-15	
	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	
Lageado	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	
Bico Ganga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
Zebu Branco	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	
L. Vermelho	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
Goiano	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	
Comum Bran	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	
Dobradinho	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
Revenda	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	
Cana Roxa	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
Ligeiro	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	
Sagrimao	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	
Agulha	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
IAC-47	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	
IAC-25	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
IAC-1278	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
IR-08	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	

	OPE-15			OPE-16			OPE - 17									
Variedades	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62
Lageado	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Bico Ganga	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Zebu Branco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
L. Vermelho	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
Goiano	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0
Comum Bran	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0
Dobradinho	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Revenda	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0
Cana Roxa	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
Ligeiro	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
Sagrimao	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0
Agulha	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
IAC-47	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0
IAC-25	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
IAC-1278	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0
IR-08	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0

Quadro 2. Matriz gerada por ausência (0) e presença (1) de bandas geradas por 15 iniciadores de seqüência arbitrária aplicados no método RAPD para variedades de arroz (continuação).

	OPE-17		OPE - 18										OPE -19			
Variedades	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
Lageado	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bico Ganga	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Zebu Branco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L. Vermelho	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Goiano	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Comum Bran	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Dobradinho	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
Revenda	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
Cana Roxa	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1
Ligeiro	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Sagrimao	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Agulha	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
IAC-47	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
IAC-25	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
IAC-1278	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
IR08	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1

Variedades	OPE- 19						OPE - 20								
	79	80	81	82	83		84	85	86	87	88	89	90	91	
Lageado	0	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
Bico Ganga	1	1	0	1	0		0	0	0	0	0	0	0	0	
Zebu Branco	0	0	0	0	0		0	0	0	0	1	1	0	0	
L. Vermelho	0	0	0	0	1		1	1	1	0	0	0	1	0	
Goiano	0	0	0	0	0		0	1	1	1	1	0	1	1	
Comum Bran	1	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	1	0	
Dobradinho	1	1	1	1	0		1	1	0	1	0	0	0	0	
Revenda	0	1	0	0	0		0	0	0	1	0	0	0	0	
Cana Roxa	0	1	0	1	0		1	1	0	1	0	1	1	0	
Ligeiro	0	1	0	0	0		1	1	1	1	0	0	1	0	
Sagrimao	0	1	0	0	0		1	1	0	1	1	0	0	0	
Agulha	0	0	0	0	0		0	0	0	1	0	0	0	0	
IAC-47	0	0	0	0	0		1	1	0	1	0	0	0	0	
IAC-25	1	1	0	0	0		1	1	0	1	1	0	1	0	
IAC-1278	0	1	0	0	1		1	1	1	1	1	0	0	0	
IR-08	0	1	0	0	0		1	1	1	1	1	0	1	0	

Quadro 3. Matriz gerada por ausência (0) e presença (1) de bandas geradas por 15 iniciadores de seqüência arbitrária aplicados no método RAPD para variedades de arroz (continuação).

O número médio de bandas polimórficas dentro do grupo das variedades locais foi de 5,73 e dentro do grupo das cultivares melhoradas do IAC foi de 2,60 (Tabela 5). Esse resultado indica que as variedades locais têm maior variabilidade do que as cultivares melhoradas, o que já era esperado. O número médio de bandas polimórficas entre os grupos foi de 6,00. Quando comparados os grupos formados pelas variedades locais e das cultivares do IAC com a cultivar IR-08 da Filipinas, o valor do número médio de bandas polimórficas foi de 5,80 e 3,13, respectivamente. Os valores do número médio de bandas de 2,60 dentro do grupo de cultivares IAC e de 3,13 quando comparado com IR-08, sugerem que não há muita variabilidade entre essas cultivares. Isso também já era previsto uma vez que todas essas cultivares passaram por programas de melhoramento genético.

Tabela 5. Número médio de bandas polimórficas por iniciador entre grupos de variedades de arroz.

Item comparados	Número médio de bandas
Entre variedades locais	5,73
Entre cultivares IAC	2,60
Entre variedades locais versus cultivares IAC	6,00
Entre variedades locais versus IR-07	5,80
Cultivares IAC versus IR-07	3,13

A variação do número médio de bandas polimórficas sugere que quanto menor esse valor, maior o grau de similaridade genética entre as variedades e as cultivares. Esse valor pode ser usado também como uma estimativa da similaridade genética entre diferentes variedades ou espécies. A alta variabilidade verificada entre as variedades locais estudadas, nesse trabalho, provavelmente é devido a condições de pressão de seleção que permitiram a manutenção simultânea de mais de um alelo por loco, nos quais são gerados o polimorfismo. *Oryza sativa* é predominantemente autógama na natureza (< 1% de polinização cruzada) e, portanto, uma baixa variação dentro dessa

espécie é esperada. Entretanto, essa variação poderia aumentar pela polinização cruzada natural que é influenciada pela morfologia floral e fatores ambientais.

A informação mais importante desse estudo é a constatação da maior variabilidade genética encontrada entre as variedades locais, aumentando a possibilidade do uso desses genótipos para programas de melhoramento vegetal.

Estes dados indicam que o estudo de diversidade genética empregando a técnica de RAPD é promissor, já que a simples análise do número médio de bandas produzidas por iniciadores possibilita a obtenção de informações sobre o distanciamento genético entre as variedades facultando observar diferenciações a nível de DNA entre genótipos que possuem graus diferenciados de melhoramento, sem a necessidade de construção de dendrogramas.

2.6.4 Comparação de Dendrogramas

Em geral, os coeficientes são diferenciados entre si pela forma que a matriz de dados originais (1 = presença e 0 = ausência do marcador de RAPD) é empregada na estimativa da similaridade. Quando dois genótipos são comparados, as seguintes situações podem ocorrer: $a = 1,1$; $b = 1,0$; $c = 0,1$ e $d = 0,0$. Assim, os coeficientes de Nei & Li, de Jaccard, e de Ochiai são semelhantes uma vez que não levam em consideração as ocorrências negativas (0,0), enquanto os coeficientes de Russel & Rao, Simple Matching e de Rogers & Tanimoto incluem as ocorrências negativas. Além disso, existem pequenas variações entre estas duas classes de coeficientes.

O coeficiente de Dice (DICE, 1945) calculado pelo no programa NTSys (ROHLF, 1988 ou 1992) é idêntico ao de Nei & Li (1979), estes coeficientes calculam o grau de afinidade desconsiderando a concordância negativa (0,0) e, atribuem peso duplo à concordância positiva (1,1).

Através da comparação dos dendrogramas gerados pelo algoritmo UPGMA utilizando-se os coeficientes de similaridade, pode-se observar a formação de três grandes grupos (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10). O primeiro grupo é formado pelas variedades que foram melhoradas e as que presumivelmente já sofreram algum tipo de melhoramento: IR-08 e IAC-1278, IAC-25, IAC-47, Agulha, Sagrimão, Ligeiro e Cana Roxa. Um segundo grupo foi formado pelas variedades Arroz de Revenda, Dobradinho e Comum Branco e, por último, observa-se um grupo contendo as variedades Ligeiro Vermelho e Zebu Branco. A posição das variedades Goiano, Bico Ganga e Lageado sofre alterações de acordo com o coeficiente de similaridade empregado. Elas podem ser observadas ora como grupos independentes ora dentro dos grupos já mencionados.

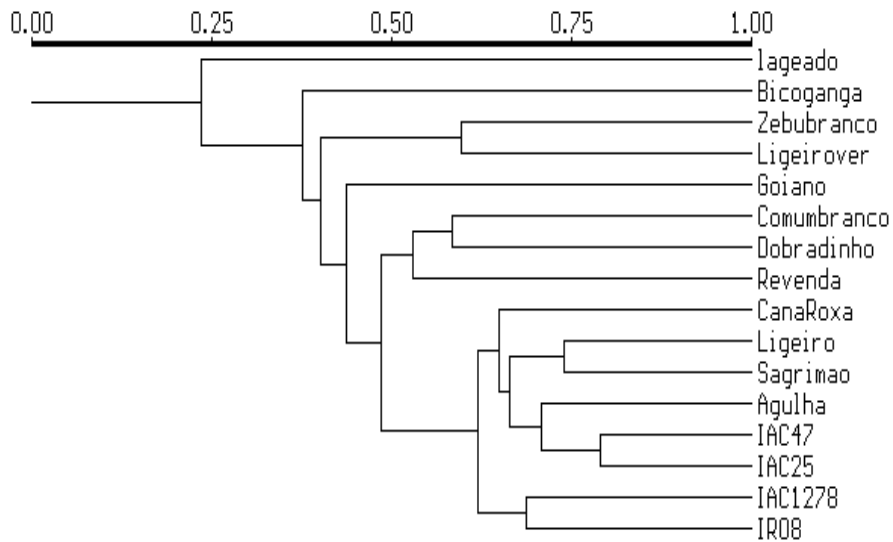


Figura 6. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Nei & Li, que não considera ausência da banda como similaridade.

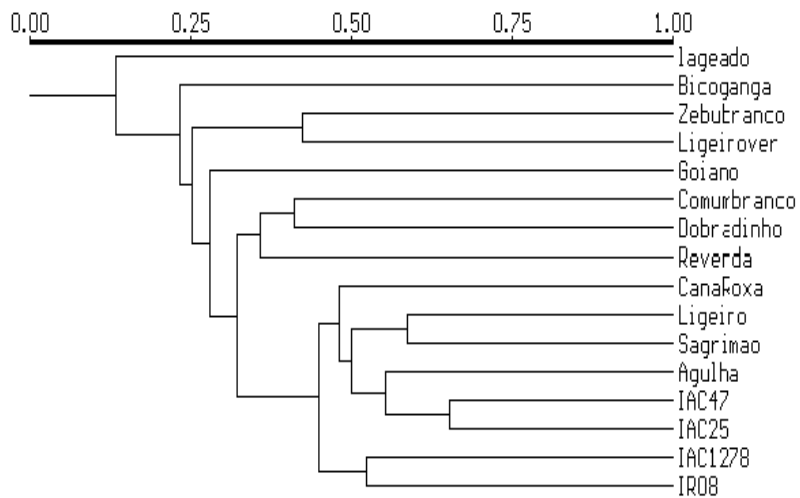


Figura 7. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Jaccard, que não considera ausência da banda como similaridade.

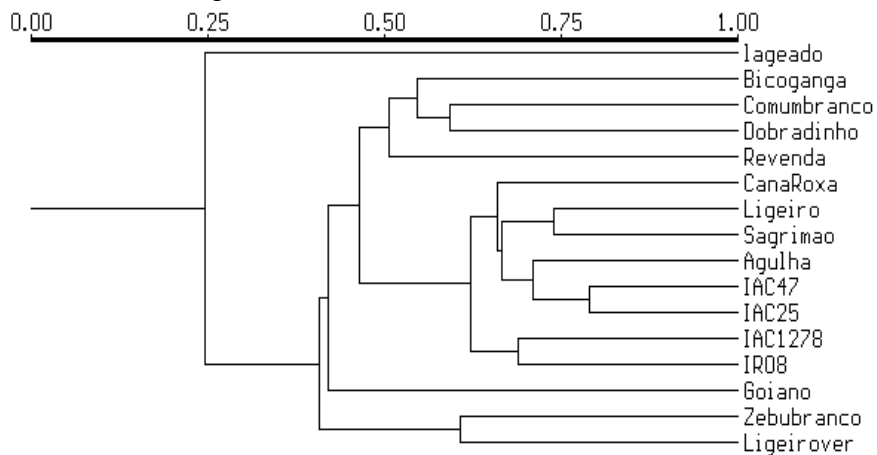


Figura 8. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Ochiai, que não considera ausência da banda como similaridade.

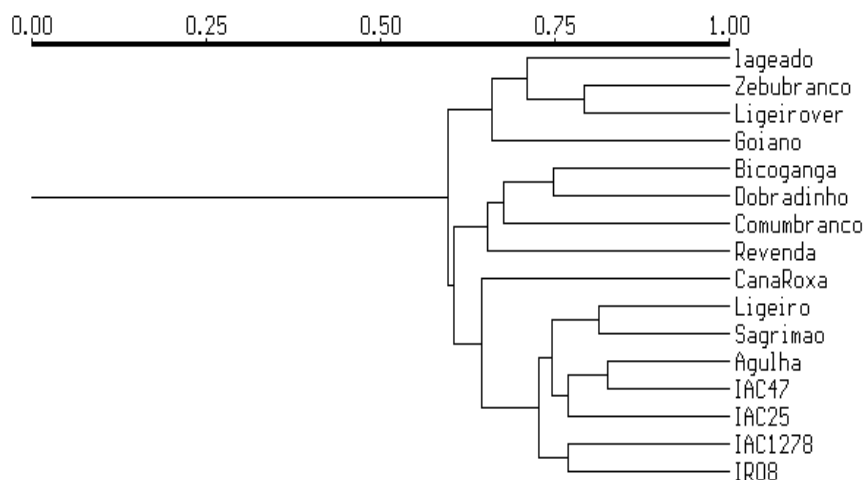


Figura 9. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Simple Matching, que considera ausência da banda como similaridade

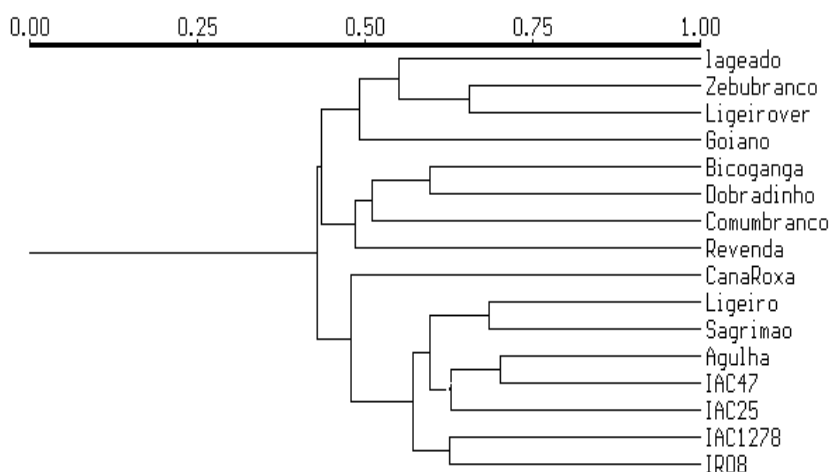


Figura 10. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Rogers & Tanimoto, que considera ausência da banda como similaridade

O dendrograma obtido a partir da matrix de similaridade utilizando o coeficiente Russel & Rao (Figura 9) apresentou baixa resolução, não sendo capaz de discriminar as diferentes Unidades Taxonômicas Operacionais - OTUs, e por esse motivo não foi considerado. Observa-se que não houve formação de grupos distintos, o dendrograma demonstra que todas as variedades estudadas originam de um ancestral comum, não sendo possível inferir mais nenhuma informação a partir deste ponto.

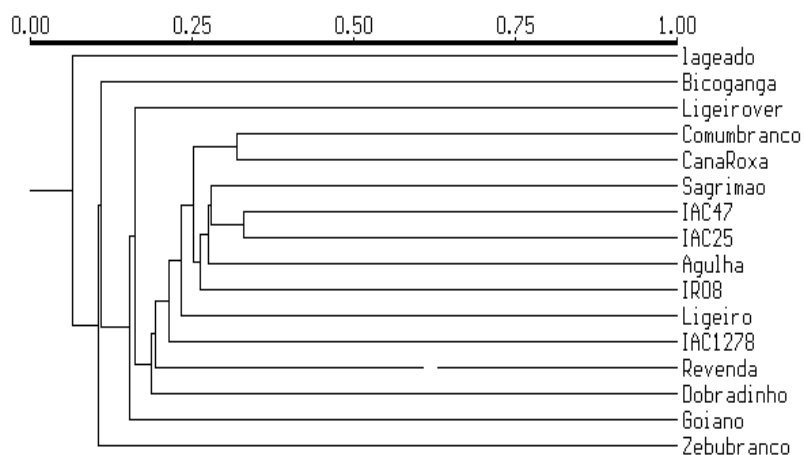


Figura 11. Dendrograma gerado pelo algoritmo UPGMA utilizando-se o coeficiente de similaridade Russel & Rao, que considera ausência da banda como similaridade

É importante destacar que as cultivares IR-08 e IAC-1278 foram melhoradas para o sistema de cultivo irrigado. As variedades IAC-25 e IAC-47 foram melhoradas para o sistema de cultivo de sequeiro. Sagrimão é uma variedade melhorada introduzida no Estado do Maranhão pela Secretaria de Agricultura do Maranhão (SAGRIMA).

Baptista (2000) estudando cinética de absorção observou que a variedade Agulha teve um comportamento semelhante ao de variedades melhoradas de arroz. No presente trabalho, essa variedade agrupou próximo às variedades melhoradas IAC 47 e IAC 25, mostrando um coeficiente de similaridade de aproximadamente 78 % com a variedade IAC 47 pelo coeficiente de Nei & Li. Portanto, esses resultados confirmam relatos obtidos anteriormente de que a variedade Agulha já sofreu melhoramento genético para alguma característica de importância agrônômica.

As variedades Ligeiro Vermelho e Zebu Branco, coincidentemente, apresentam o mesmo teor de proteína bruta no grão que é de 8.2%, são medianamente tolerante a alumínio, possuem ciclo vegetativo em torno de 120, dias e rendimento de 2.000 Kg/há e apresentam até 25% de plantas acamadas por ocasião da colheita, o que corrobora os dados de proximidade encontrados na análise filogenética (FERRAZ Jr et al., 1998 ou 1997; MENDONÇA, 1991).

Vale mencionar que dentre as variedades avaliadas a Lageado apresenta uma produção média em torno de 4.000 Kg/ha, podendo alcançar até 8000 Kg/ha, apresenta ciclo longo em torno de 180 dias, apresenta até 75% de plantas acamadas por ocasião da colheita, é adaptada à regiões de várzea, sendo o seu cultivo feito somente em regiões de baixadas. Observa-se que esta variedade é tolerante a presença de alumínio tóxico. Por este motivo ela é uma das variedades mais cultivadas nas áreas dos Chapadões, caracterizada pela predominância de solos com altos teores de alumínio (FONSECA et al., 1982). De maneira bastante interessante, observou-se que Lageado foi a variedade mais divergente. A Lageado juntamente com a variedade Dobradinho são as únicas dentre as variedades que são sensíveis ao alumínio (MENDONÇA, 1991). A Lageado apresenta uma característica típica das variedades de arroz não melhoradas que é o acamamento das folhas, uma vez que para melhorar a produtividade do arroz e aumentar a atividade fotossintética um dos primeiros fatores modificados pelos melhoristas costuma ser o ângulo de inserção da folha, tornando-as mais eretas. Os dendrogramas obtidos com os coeficientes que não consideram a concordância negativa (0,0), não agrupam a Lageado com nenhum dos outros OTUs estudados, indicando uma maior distância genética entre esta variedade e o restante do material.

Somando a isso, Fonseca et al. (1982) relata que o cultivo de arroz é mais acentuado na região leste do Estado do Maranhão, mais precisamente nas áreas de Caxias e Codó, com características edofo-climáticas específicas, onde predominam o cultivo das variedades locais Lageado, Ligeiro, Agulha, Zebu.

Na tabela 6, as variedades locais do Maranhão estão agrupadas segundo o local de coleta (município ou comunidade) de acordo com a informação obtida do Centro Nacional de Pesquisa do Arroz e Feijão- Embrapa que forneceu as sementes utilizadas nos experimentos.

Tabela 6. Local de coleta das variedades locais utilizadas no experimento.

Controle CNPAF	Variedades locais de arroz	Ciclo (dias)	Município ou Comunidade de coleta no Estado do Maranhão
CA790001	Lageado	120	Corne Cru – Br 316 km10
CA790054	Dobradinho	150	Mun. Codó – Povoado de Montevideo
CA790057	Agulha	120	Caxias Terezina Br 316 km10
CA790088	Arroz de Revenda	120	Caxias – São João dos Patos
CA790033	Goiano	128	Mun. Pedreiras – Montivideo
CA790052	Ligeiro Vermelho	150	Mun. Codó – Povoado de Montevideo
CA790138	Sagrimão	125	Mun. Bacabal
CA790180	Bico Ganga	126	Mun. João Lisboa
CA790121	Zebu Branco	128	Mun. São Domingos -
CA790102	Ligeiro	90	Caxias – São João dos Poleiros
CA790160	Comum Branco	132	Mun. Lima Campos – Tucunzal

GUIMARÃES et al(1996), em seu trabalho de revisão, relata que na década de 1970, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), lançou as cultivares IAC 47 e IAC 25. Desde então elas são cultivadas em praticamente toda a área de sequeiro do país. Na década de 1980, o IAC lançou as cultivares IAC 164 e IAC 165. Todavia, essas cultivares foram originárias dos cruzamentos de IAC 4246 com IAC 1391 ou Dourado Precoce, o que implica em uma semelhança genética bastante grande entre elas. Apesar do lançamento por várias instituições de pesquisa em meados dos anos 80, de cultivares de arroz de sequeiro tais como Araguaia, Douradão, Guarani e Emcapa 01, que ganharam projeção em termos de área plantada no Brasil, analisando-se a base genética dessas cultivares, chega-se a conclusão que houve pouco aumento da variabilidade genética existente, pois em todos esses materiais pelo menos um dos progenitores continuou sendo o IAC 47 ou IAC 25. Pela análise filogenética obtida pode-se observar que existe uma base genética bastante larga de arroz que pode ser utilizada em futuros programas de melhoramento.

Deste modo, é bastante provável que um dos progenitores das variedades Agulha, Sagrimão, Ligeiro e Cana Roxa tenha sido o IAC-47 ou o IAC 25.

O nível de similaridade entre as variedades mais distante Lageado/Ligeiro foi de 16% (distância genética de 84%), demonstrando que o nível de variação genética dentro das variedades estudadas é substancial, e sugere que a base genética do germoplasma é extensa.

Em geral, a base genética das cultivares melhoradas de arroz de sequeiro cultivadas atualmente na América Latina, e no Brasil em particular, é relativamente estreita (GUIMARÃES et al., 1996). O nosso estudo de diversidade genética das variedades locais mostrou que existe uma ampla base genética, provavelmente funcionando como reservatórios genéticos para mecanismos de tolerância a estresses ambientais e possivelmente de eficiência de uso de nutrientes, sendo que a elucidação

desses mecanismos facilitaria a conservação desses genótipos e a criação de novos genótipos através do desenvolvimento de programas de melhoramento genético.

Os resultados obtidos mostram que a utilização de diferentes coeficientes de similaridade promove pequenas alterações na classificação das variedades em grupos, porém mantendo no mesmo grupo as OTUs mais similares, mudando ligeiramente a relação entre estas no grupo. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Johns et al. (1997) que verificaram que os diferentes coeficientes de similaridade não influenciaram no agrupamento de variedades de feijão comum do Chile em grupos específicos que correspondiam aos centros de domesticação Mesoamericano e ao Andino.

A aparência similar entre os dendrogramas gerados pelos coeficientes de Jaccard, Nei & Li e Ochiai não surpreendem, pois as generalizações sobre as propriedades destes coeficientes são semelhantes. Jackson et al. (1989) estudando as relações genéticas entre espécies diferentes de peixes utilizando diferentes coeficientes verificaram que a análise dos dendrogramas obtidos com coeficientes de Jaccard e de Nei & Li mostra uma forte similaridade entre si.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que um aspecto importante a ser considerado é a exclusão de ocorrências negativas no coeficiente. A inclusão, em alguns casos, de uma ausência de banda como indicativo de similaridade, parece nem sempre ser necessariamente verdadeira. Fazendo exame na consideração da base genética de marcadores de RAPD, Williams et al. (1990) sugerem que a ausência de amplificação de uma determinada banda em dois genótipos não representa necessariamente a similaridade genética entre eles. Segundo Alfenas (1998) é difícil interpretar o significado biológico da concordância negativa (0,0) como critério de semelhança, portanto, por este motivo estes autores também consideram limitada a utilização da concordância negativa nos coeficientes de similaridade.

2.6.5 Correlações entre os Coeficientes

As correlações entre os coeficientes de similaridade genética são apresentadas na Tabela 5. As correlações obtidas variaram de 0,30 a 0,95, sendo o coeficiente de Russel & Rao o que obteve as mais baixas correlações.

Altas correlações foram obtidas para os coeficientes de Jaccard, Nei & Li e Ochiai, indicando que esses coeficientes são altamente relacionados. Estas altas correlações entre os coeficientes de similaridade Jaccard, Nei & Li e Ochiai parecem ser constantes quando aplicados a estudos de relação genética. Johns et al. (1997) em um estudo com os marcadores RAPD em feijão comum, encontraram valores de correlações da ordem de 0,989 e 0,972 entre as distâncias genéticas obtidas pelo complemento do coeficiente combinando Jaccard e Nei & Li e Jaccard e Ochiai.

Verificou-se que os coeficientes estudados alteraram a projeção bidimensional formando número diferenciado de grupos pelo método de agrupamento UPGMA.

Tabela 7. Matriz de similaridade genética referente coeficientes a correlações de Spearman*.

COEFICIENTES	J	NL	O	SM	RT	RR
J	1,00					
NL	0,95	1,00				
O	0,88	0,89	1,00			
SM	0,68	0,70	0,69	1,00		
RT	0,62	0,63	0,46	0,67	1,00	
RR	0,47	0,51	0,90	0,36	0,30	1,00

* Definições das abreviaturas estão na tabela 2.

2.7 CONCLUSÕES

Marcadores de DNA do tipo RAPD mostraram ser ferramentas úteis na avaliação da variabilidade genética de arroz.

O arroz apresenta elevada média de bandas polimórficas por iniciador, quando comparado com *Arabidopsis thaliana*, soja, milho e *Neurospora crassa*.

Dentre os coeficientes estudados os de Nei & Li, de Jaccard e de Ochiai foram considerados os mais adequados, pois provocaram poucas alterações entre variedades com alta similaridade genética, distinguindo entre o nível de melhoramento das variedades estudadas, enquanto os de Simple Matching e de Rogers & Tanimoto foram ligeiramente inferiores colocando variedades distantes no mesmo grupo.

Este trabalho demonstrou que RAPD é uma técnica eficiente para detectar polimorfismo e determinar a relação genética entre e entre e dentro variedades e cultivares.

3. CAPITULO II

EFICIÊNCIA DE ABSORÇÃO DE NITROGÊNIO EM ARROZ (*Oryza sativa* L.)

3.1 RESUMO

O emprego de variedades de arroz mais eficientes na absorção e utilização de N é uma estratégia importante para reduzir o custo da produção com relação do uso de fertilizantes nitrogenados. Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação no departamento de Solos-UFRRJ, utilizando-se cinco variedades de arroz de sequeiro (Lageado, IAC 47, Dobradinho, Agulha e Bico Ganga), cultivadas em solução nutritiva, com dois níveis, 20 e 60 mgN/L, nas formas de NH_4^+ e NO_3^- . O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito de níveis e formas de N sob os parâmetros cinéticos de absorção de N, a extrusão de prótons, da atividade das enzimas de assimilação de N, e da partição de N na planta, e, verificar se esses parâmetros podem ser usados como marcadores moleculares bioquímicos para a seleção de variedades eficientes na absorção e utilização de N em plantas de arroz. Observou-se uma ampla variação dos parâmetros cinéticos e bioquímicos. Houve um comportamento diferencial entre as variedades quanto à capacidade de absorção e uso de N. As variedades Agulha e IAC 47 apresentaram a melhor combinação de K_M , $V_{m\acute{a}x}$, GS/GOGAT em condições de alta disponibilidade de N-nítrico no meio, sob condições de baixa disponibilidade de N.

Palavras-chave: Absorção de nitrogênio, parâmetros cinéticos, hidroponia

3.2 ABSTRACT

The use of more efficient varieties of rice in the absorption and utilization of N is an important strategy for the sustainable agriculture and environmental quality. Two experiments were conducted in greenhouse, using 5 upland rice varieties, in nutrient solution, with two levels of N, 20 or 60 mg N/L, in the forms of NH_4^+ and NO_3^- with the objective to studies the effect of levels e forms of N under the kinetics parameters, proton extrusion, the activity of the N-assimilation enzymes and the N-partition in the plant, and, to verify if these parameters can be used as marker meolecular biochemists for the seletion of efficient varieties in the uptake and use of N in rice plants. Was observed an variation ample of the kinetics parameters and biochemists. It had distinguishing behavior among varieties in the uptake and use of N. The varieties Agulha and IAC-47 had presented the best combination of K_M , $V_{m\acute{a}x}$, GS/GOGAT in conditions of hight avaibility of N- NO_3^- , and Bico Ganga, in conditions of low avaibility of N- NO_3^- in nutrient solution.

Keywords: Nitrogen uptake, kinetics parameters, hdroponic.

3.3 INTRODUÇÃO

A perspectiva de melhorar a eficiência de aplicação e de uso de fertilizantes em plantas, surge com a mudança de paradigma na agricultura, caracterizado pela diminuição dos custos de produção e redução expressiva dos riscos de poluição decorrentes das aplicações de agroquímicos (CALÇADO & ESTANISLAU, 1999; HIREL et al, 2001).

Além da contaminação ambiental, o uso de altas doses de fertilizantes tem provocado redução na eficiência de absorção e utilização de nutrientes, principalmente N (HIREL et al., 2001). No caso de N, isso ocorre, por que os sistemas de transporte de nitrato e amônio e as atividades das enzimas de assimilação de N foram indiretamente selecionadas para menor afinidade pelo substrato – maior K_M , isso significa que essas proteínas precisam de maiores concentrações de fertilizantes nitrogenados para se tornarem ativas (TEIXEIRA Jr., 1999).

Diante disso, tornou-se evidente que a pesquisa deveria seguir em outra direção, ao invés de modificar o ambiente em benefício das plantas, deveria estudar a possibilidade de adaptar as plantas ao ambiente. Com esse objetivo, inúmeros trabalhos têm se desenvolvido com o intuito de identificar genótipos mais eficientes na absorção e utilização de nutrientes (VANDERMEER, 1995).

A seleção de genótipos mais eficientes envolve estudos que vão além da simples identificação de plantas que possuem sistemas de transporte mais eficientes. Considerando-se que a absorção iônica é regulada por fatores bioquímicos que afetam as taxas de influxo de nutrientes requeridos em todo o desenvolvimento vegetal, a expressão da regulação dos processos de absorção e assimilação de N em plantas poderá ser, no futuro, o diferencial para seleção de genótipos eficientes na absorção desse nutriente (CLARKSON & HAWKESFORD, 1993).

O objetivo desse trabalho foi analisar o efeito de níveis e formas de N sob os parâmetros cinéticos de absorção de N, a extrusão de prótons, a atividade das enzimas de assimilação de N, e a partição de N na planta, e, verificar se esses parâmetros podem ser usados como marcadores moleculares bioquímicos para a seleção de variedades eficientes na absorção e utilização de N em plantas de arroz.

3.4 REVISÃO DE LITERATURA

3.4.1 Cultura do Arroz de Sequeiro

O arroz de sequeiro, também denominado de arroz de “terras altas” ou de “terras firmes”, é cultivado, no Brasil, com os seguintes objetivos: -i. plantio de subsistência; comum nas regiões norte e nordeste; -ii. plantio de transição, comum na região centro-oeste; e -iii. plantio comercial, nas regiões sudeste e sul (GUIMARÃES et al. 2000).

A produção de arroz de sequeiro atinge, anualmente, cerca de três milhões de hectares no Brasil, representando 68% da área cultivada e 3.444 mil toneladas, totalizando 40% da produção anual; com produtividade média de 1.452 kg/ha (IBGE, 1999).

A região nordeste é a maior produtora, com 37,2% da produção, sendo o Estado do Maranhão o maior produtor nacional de arroz de sequeiro (IBGE, 1997).

A cultura de arroz de sequeiro no Maranhão divide-se em dois níveis de tecnologias: -i. a chamada cultura de toco, no norte do Estado, consorciada, cujos processos de produção são manuais e atividade que tende a ser migratória; -ii. o sistema de monocultura, no Centro-sul do Estado, mecanizado. As variedades cultivadas têm maior aceitação comercial, e as condições agroclimáticas são favoráveis à rizicultura (GUIMARÃES et al., 2000).

Nos últimos anos, observa-se que a área cultivada com arroz de sequeiro vem diminuindo. Para aumentar o estímulo à rizicultura, as empresas e institutos de pesquisa lançaram variedades adaptadas a condições de baixa fertilidade, com alto índice de rendimento e resistentes à doenças (GUIMARÃES et al., 1996).

Não obstante, ser o melhoramento genético do arroz de sequeiro uma das alternativas para resolver os problemas do cultivo, a possível uniformidade genética produzida pelo melhoramento, muitas vezes, pode trazer conseqüências piores que os problemas que visam solucionar.

Nos anos 70, o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), lançou as cultivares IAC 47 e IAC 25 (GUIMARÃES, 1996). Desde então elas são cultivadas em praticamente em toda a área de sequeiro do país. Na década de 80, o IAC lançou as cultivares IAC 164 e IAC 165. Todavia, essas cultivares foram originárias dos cruzamentos de IAC 4246 com IAC 1391 ou Dourado Precoce (progenitores de IAC 47 e IAC 25), o que implica em uma semelhança genética bastante grande entre elas. Apesar de, em meados dos anos 80, várias instituições de pesquisas lançarem cultivares de arroz de sequeiro tais como Araguaia, Douradão, Guarani e Emcapa 01, que ganharam projeção em termos de área plantada no Brasil, analisando a base genética dessas cultivares, chega-se a conclusão que houve pouco aumento da variabilidade genética existente, pois em todos esses materiais pelo menos um dos progenitores continuou sendo o IAC 47 ou IAC 25.

Atualmente, existe uma consciência coletiva da necessidade de fortalecer a rizicultura de sequeiro no Brasil. Para tal a opção mais lógica é ampliar as áreas cultivadas, utilizando variedades adaptadas às condições das mesmas (GUIMARÃES et al., 2000). Isto exige a busca de genótipos que sejam eficientes no uso de nutrientes e que apresentem melhor qualidade nutricional e níveis aceitáveis de produtividade.

Sabe-se que em áreas tradicionais em cultivo de arroz, como o Estado do Maranhão, inúmeras cultivares locais, mantidas por agricultores geração após geração, representam valioso patrimônio genético (FONSECA et al., 1990). A experiência com estas cultivares aponta para o alto valor das mesmas como fontes de genes para o melhoramento genético, não só para o teor de proteínas reservas como também para

adaptação a estresses ambientais (MENDONÇA, 1991, BAPTISTA, 1995, FERRAZ JR. et al, 1997; SOUZA et al, 1998, 1999).

Hoje, no Brasil, estão disponíveis, cerca de 37 cultivares de arroz que são recomendadas pela EMBRAPA/CNPAP (1997) para o sistema de sequeiro de acordo com sua adaptabilidade às diferentes regiões edafoclimáticas (Tabela 1), entre essas cultivares só há uma representante, a Pratão Precose, das variedades consideradas “variedades locais” do Estado do Maranhão, que segundo Fonseca et al. (1990) totalizam 50 variedades.

Tabela 1. Relação das cultivares de arroz recomendadas para o cultivo nos sistemas de sequeiro no Brasil para safra 1997/1998.

Cultivares	Cultivares	Cultivares	Cultivares
Araguaia	Cuiabana	Douradão	Progresso
Caiapó	Centro América	Palha Murcha	Maravilha
Carajás	Confiança	Pratão precose	Mearim
Canastra	Batatais	Primavera	Guarani
Rio Doce	Rio Paranaíba	Rio Paraguai	Rio verde
Tangará	Triunfo	Uruçui	Xingu
IAPAR 9	IAPAR 62	IAPAR 63	IAPAR 64
EEPG 369	EMCAPA 01	IAC 25	IAC 47
IAC 164	IAC 165	IAC 201	IAC 202
IAC 1246			

Fonte : EMBRAPA, 1997.

Como a base genética das variedades melhoradas de arroz de sequeiro cultivadas atualmente na América Latina, e no Brasil em particular, é relativamente estreita (GUIMARÃES et al., 1996; SILVA et al., 1999), o estudo de variedades locais torna-se cada vez mais necessário.

3.4.2 O Genoma do Arroz e o Melhoramento Genético.

Na agricultura, o conhecimento do patrimônio genético das plantas deverá facilitar os trabalhos de melhoramento genético com a intenção de obtenção de plantas mais produtivas, mais eficientes na absorção de nutrientes e mais resistentes às pragas e doenças.

Essa foi a diretriz principal que motivou a identificação da composição genética do arroz que foi feita por cientistas de dez países: Japão, China, Coréia do Sul, Índia, Taiwan, Tailândia, França, Reino Unido, Canadá e Estados Unidos, na Universidade de Washington, em Seattle (EUA). A empresa Monsanto foi patrocinadora do projeto.

O tamanho do genoma do arroz foi estimado pela citogenética clássica em torno de 400 Mbp, consistindo em 12 pares de cromossomos (2n) (FUKUI & LIJIMA, 1991). O genoma do arroz é o menor entre os cereais: 37 vezes menor que o do trigo e 6 vezes menor que o do milho. Por esse motivo, a identificação de seu código genético pode facilitar as pesquisas de decodificação de genomas de plantas mais complexas. Saber localizar um gene no genoma do arroz pode ajudar a achar o mesmo gene no código do trigo, por exemplo. Apesar da seqüência ainda não estar totalmente definida, sabe-se a localização e função de 85% dos genes e que o genoma conserva uma grande colinearidade genética (sistemia). Essas características fazem desta planta um modelo para o mapeamento comparativo de gramíneas (AHN et al., 1992 e 1993; KURATA et al., 1994, SASAKI, 1998). De acordo com Ahn & Tankley (1993), aproximadamente 72% dos locis de cópia simples em arroz são duplicados no milho moderno.

O trabalho de sequenciamento do genoma do arroz começou com a extração de células de diferentes tecidos da planta. A partir daí, conseguiu-se isolar os mRNAs responsáveis pela síntese das proteínas desses tecidos e, após convertê-los em moléculas de cDNA (DNA complementar ao mRNA) foi possível cloná-los em bactérias. Nesse processo obtiveram-se milhares de bactérias, cada uma contendo uma molécula de cDNA correspondente a cada um dos genes expressos nos diferentes tecidos da planta. Essas bactérias foram selecionadas, e a molécula de cDNA contida em cada uma delas foi sequenciada. Dessa maneira, pode-se dispor de uma quantidade enorme de informações sobre as funções dos genes e sua expressão em cada tecido da planta (SASAKI, 1998; WILLIAM & MILLER, 2001). Esse método permitiu conhecer apenas os chamados genes expressos ou genoma funcional da planta, entretanto a identificação da função de todos os genes esta, prevista para ser concluído em 2010.

A identificação e seleção de indivíduos de genótipos superiores, ou seja, possuidores de características economicamente importantes, como teor de proteína e rendimento de grãos, resistência à doenças e pragas sempre foi uma tarefa que apresentou grandes desafios em melhoramento vegetal (MILACK, 1998).

No futuro, a conciliação dos conhecimentos de Nutrição Mineral de Plantas com a de Manipulação Genética possibilitarão a identificação e seleção de indivíduos de genótipos superiores, ou seja, possuidores de características agronômicas economicamente importantes, como teor de proteína de reserva e rendimento de grãos, resistência a doenças e pragas, e se constituirá na base para o melhoramento vegetal.

3.4.3-Nitrogênio

O nitrogênio é o quarto elemento mais abundante nas plantas, contém de 1 a 5% sendo superado apenas pelo carbono, oxigênio e hidrogênio. É constituinte essencial de aminoácidos, proteínas, bases nitrogenadas, ácidos nucléicos, hormônios e clorofila, entre outras moléculas (MARCHNER, 1995).

Em sistemas, agrícolas os ingressos de N no meio de cultivo são, principalmente, de origem antrópica e incluem a adição de adubos e de matéria orgânica.

Nos campos agrícolas, a maioria dos fertilizantes nitrogenados aplicados ao solo está na forma de uréia, principal fonte de N dos fertilizantes comercializados no Brasil, e em regiões onde o pH do solo é naturalmente baixo ou não foi devidamente corrigido, ou em solos de várzeas (fatores limitadores ao processo de nitrificação), amônio é a forma de N presente no perfil do solo. Entretanto, em áreas que sofreram adubações corretivas, o nitrato é a principal forma de N disponível para as plantas (COELHO et al., 1991).

Com a notável exceção da cultura do arroz irrigado e poucas espécies vegetais, para a maioria das plantas, dependendo da concentração, a forma amoniacal tem efeito tóxico para as células. Entretanto, apesar de a maioria das espécies vegetais terem dificuldade de desenvolverem adequadamente quando o amônio é fonte exclusiva de N, foi observado que o crescimento vegetal pode ser beneficiado, quando as plantas são fertilizadas com uma fonte contendo nitrato e amônio (HOWITT & UDVARDI, 2000).

Embora a concentração de NH_4^+ nos solos seja freqüentemente mais baixa do que a de NO_3^- , a diferença em concentrações não reflete a preferência de absorção de cada forma de N pelas plantas (MARSCHNER, 1995). Observa-se em nutrição de planta a existência da preferência, da maioria das plantas, pelo N na forma de NH_4^+ quando ambas as formas estão disponíveis (MARSCHNER, 1995, FERNANDES & ROSSIELLO, 1995). Provavelmente, porque NH_4^+ requer menos energia para a absorção e a assimilação que NO_3^- , pois NO_3^- tem que ser reduzido antes de se assimilado (Bloom et al., 1992). Todavia, quando plantas são crescidas em soluções nutritivas contendo concentrações milimolares de ambas as formas de N observa-se que

o desenvolvimento vegetal é incrementado. Aparentemente, a nutrição conjunta de nitrato e amônio favorece a manutenção da homeostasia de pH durante assimilação de nitrogênio (SMITH & RAVEN, 1979).

Devido a que na natureza, amônio e nitrato estão disponíveis em concentrações diferentes, podendo variar em ordens de magnitude, de micromolar a milimolar na solução do solo (WILLIAM & MILLER, 2001), as células vegetais desenvolveram sistemas de transporte que as capacitaram a absorver eficientemente amônio e nitrato em diferentes concentrações.

Dados moleculares indicam que o desenvolvimento desses transportadores aconteceu, durante a história evolutiva, bem antes do aparecimento de células de eucariótos. Por essa razão, os transportadores de amônio e de nitrato em plantas, animais e bactérias possuem, entre eles, similaridade estrutural e funcional. Os reguladores dos sistemas de transporte também são similares, embora plantas superiores tenham mecanismos complexos de regulação que integram o transporte de amônio e nitrato ao metabolismo celular (HOWITT & UDVARDI, 2000).

Quando a nutrição mineral é feita exclusivamente com NH_4^+ , observa-se redução no crescimento dos vegetais (GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001), que poderia ser atribuída a problemas de toxidez de NH_4^+ (MARSCHNER, 1995), à mudanças hormonais no xilema, ocasionada pela presença do NH_4^+ ou à repressão da absorção de cátions, provocada pela acidificação da rizosfera quando NH_4^+ é absorvido e assimilado (NELSON & HARVEY, 1999). Uma outra razão para o crescimento restrito das plantas que são nutridas exclusivamente NH_4^+ poderia estar o relacionado à ausência de NO_3^- .

Segundo Stitt (1999), o nitrato não é somente uma fonte de N importante, mas também um íon essencial para a translocação de cátions no xilema, sua presença é um sinal que induz a expressão dos genes envolvidos na absorção e na assimilação de N, e também no metabolismo do ácidos orgânicos. Em plantas de tabaco, Walch-Liu et al. (2000), comparando o crescimento de plantas crescidas em solução somente com N- NH_4^+ com plantas mantidas em solução com uma mistura de N- NH_4^+ e N- NO_3^- , observaram que as folhas das plantas crescidas em solução com N- NH_4^+ ficaram menores e que houve uma redução no número de células. Eles verificaram que essas mudanças foram acompanhadas por um forte declínio na concentração de citocinina no xilema, associada ao aumento nas concentrações de ácido abscísico.

3.4.4 Absorção de NH_4^+ pelas Plantas

O mecanismo envolvido na absorção de amônio é o transporte através da plasmalema a favor de um gradiente de potencial eletroquímico, sem que haja troca por outra espécie iônica de mesma carga (uniporte). Howitt & Udvardi (2000) sugerem que esse íon pode ser transportado ativamente (acoplado à protóns) em baixas concentrações externa do íon e transportado passivamente, por canais iônicos, quando a concentração externa do íon está alta.

As propriedades físico-químicas do amônio determinam a natureza de sua interação com os transportadores. A detecção de elevada despolarização do potencial da membrana (~70 mV) em resposta a absorção de amônio evidenciam que esse é absorvido como em sua forma eletricamente carregada (cátion) e não na forma neutra (NH_3) (von WIRÉN et al., 2000).

Wang et al. (1993) estudando o influxo de NH_4^+ em arroz, verificaram que era bifásico, aparentemente mediado por dois sistemas de transporte distintos e que diferiram entre si pela alta ou baixa afinidade que apresentavam pelo substrato (HATS e LATS). Os autores observaram que em concentrações abaixo de 1 mmol de NH_4^+ , a cinética apresentava saturação em relação à concentração externa. Em altas concentrações de NH_4^+ , a cinética apresentou uma atividade linear em função de

concentração do meio externo. Nesse trabalho, os autores sugerem que evidências que o sistema de transporte de alta afinidade pode ser dependente da força próton-motriz.

Resultados similares foram descritos por von Wirèn et al. (2000) que evidenciaram a existência de sistemas de transporte de alta afinidade, com valores de K_M na faixa de 10-20 μmol .

3.4.5 Transportadores de NH_4^+

A primeira família de transportadores de amônio foi designada *Metilamônio Permease* (MEP), pois este substrato era usado para estudar a atividade desses transportadores em fungos. Dois sistemas de absorção de NH_4^+ foram identificados o MEP1 e MEP2, ambos sistemas de alta-afinidade, apresentando valores de K_M de 5-10 μM e 1-2 μM , respectivamente (von WIRÈN et.al., 2000).

Recentemente, estudos de complementação de genes heterólogos de mutante de fungo 26972c (MEP1 e MEP2) com cDNA de *Arabidopsis*, possibilitaram fazer o reconhecimento da família de transportadores MEP, em plantas, que foi denominada como '*Família de Transportadores de Amônio*' (AMT1). Entretanto, vale ressaltar que alguns membros dessa família não foram capazes de transportar metilamônio (von WIRÈN et al. 2000, WILLIAM & MILLER, 2001).

O gene AMT1.1 codifica uma proteína de 53 kD de peso molecular, que pode ser encontrada em membranas celulares de folhas e raízes. Os estudos cinéticos sugeriram que o transporte de NH_4^+ poderia ser um simporte $-\text{NH}_4^+/\text{H}^+$, ou um uniporte dependente por um potencial eletroquímico (WILLIAM & MILLER, 2001). Segundo Howitt & Udvardi (2000), o fato de ocorrer diminuições do pH externo e não haver alteração do pH citoplasmático indica que o mecanismo de absorção do NH_4^+ pelo sistema AtAMT1 não envolve cotransporte de H^+ . Outro fato que corrobora essa hipótese é que a concentração de NH_4^+ nunca excede ao valor de equilíbrio predito pela equação de Nernst. Ao contrário do que se tem observado para AMT1.1, os AMT1.2 e AMT1.3 são transportadores específicos de raízes, e apresentam baixa- afinidade pelo substrato ($K_M = 30\text{-}35 \mu\text{M}$).

Quanto à regulação dos transportadores AMTs, Gazzarrini et al. (1999) verificaram que a omissão prévia de NH_4^+ no meio de cultivo, por um período de dois dias, aumentou o influxo de NH_4^+ , coincidindo com o aumento de transcritos de AMT1.1, enquanto os transcritos de AMT1.2 e AMT1.3 se mantiveram constantes em raízes de *Arabidopsis*. Em adição, Lee e Rudge (1986) observaram que plantas de cevadas quando privada de N, por um período de tempo, incrementavam as taxas de influxo de NH_4^+ e NH_3 , sugerindo que o sistema de transporte foi induzido pela deficiência de N.

A regulação do influxo de NH_4^+ parece ser afetado pelas concentrações de amônio e aminoácidos no meio intracelular por um mecanismo de controle por retroalimentação. Howitt & Udvardi (2000) relataram que a glutamina, e não o amônio, era a responsável pela regulação da expressão de AtAMT1.1 em *Arabidopsis*. Segundo os autores os transcritos de AtATM1.1 aumentaram quando plantas privadas de NH_4^+ foram submetidas a solução com NH_4^+ . Porém, esse aumento da expressão do gene foi reduzido quando ao meio de cultura foi adicionado sulfoximina de metionina que inibe a conversão de amônio a glutamina.

Eventos bioquímicos como mudança de pH intracelular, transporte de amônio na planta, assimilação de amônio, concentração de amônio no apoplasto são fatores que aparentemente afetam o influxo de NH_4^+ em plantas.

A segunda *família de transportadores de NH_4^+* é a *AMT2*. O conhecimento desse transportador é recente e pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação. Os estudos indicam que a estrutura primária dessa proteína parece ser muito diferente da

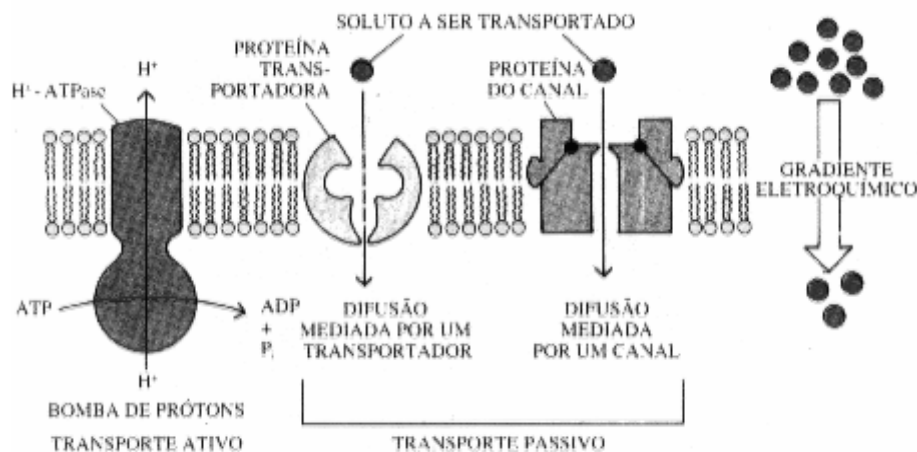
AMT1, entretanto a estrutura terciária e o mecanismo molecular de AMT2 são semelhantes a proteínas de AMT1 (HOWITT & UDVARDI, 2000).

3.4.6 H⁺-ATPases e a Absorção de N

Um dos componentes do sistema de transporte é formado pela família de bombas de cátions conhecidas como p-ATPases. Estas proteínas são amplamente distribuídas em bactérias, fungos, animais e plantas, e usam a energia da hidrólise de ATP para transportar vários cátions: H⁺, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, etc (PALMGREN, 2001). Hilário & Gogarten (1998) analisando a filogênia das H⁺-ATPases, observaram que o gene tem uma origem comum para todos os eucariotos.

A H⁺-ATPase é uma proteína de 100kDa, que atravessa a membrana por 8 a 10 segmentos agrupados em complexos, que são responsáveis pela condução do H⁺ e pela hidrólise de ATP (Figura 1) (PALMGREN, 2001).

O gradiente de prótons gerado pela enzima é a força condutora do transporte ativo de nutrientes (Figura 1). Na maioria das plantas, o transporte de nutrientes inorgânicos pelo xilema de raízes e o de substâncias orgânicas pelo floema de folhas parece depender de processos de transporte ativo. Devido a esse fato, essa enzima ocupa uma posição central nos processos de aquisição de nutrientes em plantas (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995).



Fonte: <http://www.svn.com.br/vida/celeuc.htm#ORGMOLMEMBPLAM>

Figura 1. Mecanismos de transporte (ativo e passivo) de íons através da membrana plasmática.

McClure et al. (1990) investigaram a absorção de NO₃⁻ e o fluxo de prótons nas células de raízes de milho, e evidenciaram a ligação do sistema de transporte de NO₃⁻ com a H⁺-ATPase, provavelmente em um simporte NO₃⁻/H⁺.

O mecanismo de transporte de Na⁺ no tonoplasto parece ser facilitado pela enzima H⁺-ATPase. Em células de arroz, Fukuda et al. (1998) constataram a ocorrência do antiporte K⁺/H⁺ do citoplasma para o vacúolo. O transporte era facilitado pela geração do potencial eletroquímico, e a criação através da plasmalema e do tonoplasto de gradientes protoniônicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Barkla & Pantoja (1995), mostrando que potenciais protoniônicos facilitavam a operação de antiportes H⁺/Na⁺, como mecanismo de ação que reduzem o excesso de Na⁺ do citoplasma das plantas tolerantes à salinidade.

A técnica de clonagem de genes possibilitou a investigação do mecanismo de regulação da H⁺-ATPase, sendo o primeiro gene clonado e sequenciado em *Arabidopsis* (ASSMANN, 2001). A regulação da H⁺-ATPases parece ser afetada pela absorção não balanceada de cátions e ânions, pelas alterações do pH celular, pela presença de substâncias de caráter auxínico, pela presença de cofatores, sofre inibição por chumbo e vanadato e é estimulada por fusicocina. (RAVEN, 1991, MAESHIMA, 2001).

Baptista (1995) observou uma correlação entre a extrusão de H⁺ e a velocidade de absorção de NH₄⁺ em arroz. Fernandes & Rossiello (1995) observaram correlações altamente positivas entre a intensidade de acidificação da rizosfera ou do rizocilindro, e a absorção de N e P por milho. Assmann et al. (2001) observaram que a presença de NO₃⁻ no meio externo induz à formação de H⁺-ATPases na plasmalema de milho.

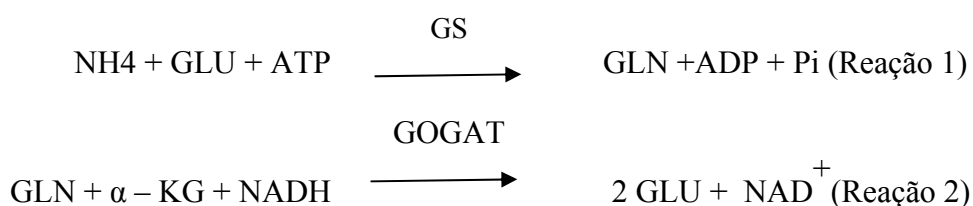
3.4.7 Assimilação do Nitrogênio

Em plantas superiores a assimilação de nitrogênio (N) é o segundo maior processo metabólico, superado apenas pela fixação fotossintética do CO₂. Os processos de redução e assimilação de N podem ocorrer nas folhas e/ou raízes, de maneira simultânea ou não, de acordo com a espécie (PATE, 1980) e com condições ambientais (FERNANDES, 1984). A forma como o N é fornecido à planta pode promover alterações nos sítios de redução e assimilação. Delú Filho et al. (1998) mostraram que a redução do nitrato em plantas jovens de seringueira aconteceu, principalmente, nas raízes, já a atividade das enzimas de assimilação de amônio foi mais alta em folhas.

No citossol das células vegetais, a presença de NH₄⁺ livre é tóxico, pois promove a dissociação entre a formação de ATP e o transporte de elétrons na respiração e na fotossíntese. Por isso, o NH₄⁺ quando chega ao citoplasma das células vegetais deve ser prontamente assimilado em moléculas orgânicas (Mifflin & Lea, 1977).

A incorporação NH₄⁺ a esqueletos de carbono pode ocorrer através de duas vias metabólicas. A primeira constitui-se da ação conjunta das enzimas glutamina sintetase (GS – EC 6.3.1.2) e da glutamato sintase (GOGAT – EC 1.4.7.1). A segunda pela ação da enzima Glutamato desidrogenase (GDH – EC 1.4.1.2). Por muito tempo, a rota GDH foi considerada a principal via de assimilação de NH₄⁺. Entretanto, a alta afinidade da GS pelo amônio, em comparação a GDH, juntamente com as altas concentrações de GS no citosol foram os fatores que evidenciaram ser a via GS/GOGAT a mais importante no processo de assimilação de N (MIFLIN & LEA, 1977).

A primeira etapa da via GS/GOGAT constitui-se na incorporação de NH₄⁺ ao glutamato (GLU) pela GS que utiliza a energia da hidrólise de ATP para formar glutamina (GLN) (Reação 1). A atividade da GS requer um cátion divalente (em geral Mg²⁺) como cofator e um agente redutor. Na segunda etapa, a GOGAT remove o grupamento amídico da glutamina e promove a ligação deste à molécula de α-ceto glutarato (α-KG) (Reação 2). A produção líquida de glutamato nesta via é de 2 moles GLU/NH₄⁺. Sendo um mol destinado à síntese dos demais aminoácidos através da ação das aminotransferases e o outro mol permanece na via.



Existem distintas isoformas de GS. A GS1 está localizada no citoplasma das células dos tecidos foliares, e a GS2 está localizada nos plastídeos. Ambas têm alta

afinidade pelo amônio, apresentando K_M que varia de 10 a 20 μM (HOWITT & UDVARDI, 2001). GS1 é uma proteína octomérica, a sua expressão é multigênica, e muitos destes genes exibem expressão tecido específica, e parece ser a isoenzima mais ativa na assimilação primária de NH_4^+ e na recuperação de NH_4^+ gerado no processo fotorespiratório. E GS2 é codificada por único gene na maioria das plantas. (GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001).

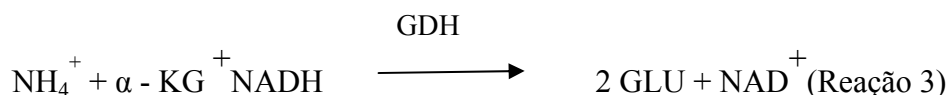
Em relação à GOGAT, dados moleculares, imunocitoquímicos, estudos bioquímicos (WALLSGROVE et al., 1987), e estudos genéticos (LEA et al., 1990) evidenciam a localização de ambas formas de GOGAT, Fd e NADH-dependente em plastídeos. Em folhas, a maior porção desta enzima encontra-se nos cloroplastos, sendo o principal agente redutor a ferredoxina, enquanto que a forma dependente do NADPH encontra-se em porções reduzidas (WALLSGROVE et al., 1983).

Quanto a NADH-GOGAT, parece haver um grande número de isoformas desta isoenzima. Em arroz, isoformas de NADH-GOGAT foram encontradas em meristema apical, cilindro central e primórdio secundário de células radiculares e observou-se que os níveis de NADH-GOGAT aumentaram epiderme de células de folhas quando NH_4^+ foi administrado (Ishiyama et al., 1998, citado por Grossman & Takahashi, 2001). Parece que o aumento da concentração de N (NH_4^+ ou/e NO_3^-) no meio de cultivo induz a atividade de NADH-GOGAT. Yamaya et al. (1995) observaram aumentos dos níveis de NADH-GOGAT em folhas com o aumento de N no meio de cultura.

Trepp et al. (1999) conduziram um experimento para determinar a localização celular da proteína de NADH-GOGAT em alfafa, e verificaram que a proteína esteja localizada em amiloplastos de nódulos de raiz. Este resultado foi corroborado pela presença do aminoácido-101no cDNA de NADH-GOGAT, que esta relacionado à compartimentação da proteína de NADH-GOGAT.

As atividades de GS e GOGAT são reguladas pela ação da luz, pela concentração de N no meio de cultivo, pelos produtos da assimilação de NH_4^+ , principalmente glutamina e pela concentração de açúcares solúveis (FERNANDES et al, 1984; MÄCK, 1995; SOUZA, 1995, YAMAYA et al., 1995)

A via GDH constitui-se na incorporação de NH_4^+ ao esqueleto de α -ceto glutarato formando um mol de glutamato (Reação 3).



A GDH está localizada nas mitocôndrias de folhas e raízes (Miflin e Lea, 1977; Souza, 1995) A atividade da GDH requer a presença do cátion Ca^{2+} como cofator enzimático e de NADH como agente redutor (HOWITT & UDVARDI, 2001).

A atividade da GDH em tecidos senescentes foi associada à oxidação de glutamato quando a disponibilidade de esqueleto de carbono era reduzida. Robinson et al. (1991) em um experimento com suspensão de células de raízes de cenoura demonstraram que GDH era ativa nas reações de oxidação de glutamato, mas não na aminação redutiva de 2-oxoglutarato. Tem-se observado que a atividade de GDH está associada também ao mecanismo de correção da toxidez de NH_4^+ (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995).

Em plantas, pode ocorrer a ação conjunta das duas vias de assimilação, dependendo da concentração de NH_4^+ no meio intracelular. Por apresentar um K_M relativamente alto para o amônio, a GDH não pode competir com a GS pelo NH_4^+ quando esse se encontra em baixa concentração na célula. Porém, Pahlich & Gerlitz (1980) encontraram K_M bifásico e dependente da concentração amônio indicando que em um ambiente com elevadas concentrações de amônio e NADH, há o

favorecimento da atividade de GDH. Além de disso, a compartimentação da GDH na mitocôndria, permite que ela possa competir com sucesso com a GS pelo amônio disponível.

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo é composto por dois ensaios utilizando-se as mesmas condições experimentais. No primeiro fez-se a determinação dos parâmetros cinéticos da absorção de N, e no segundo a análise das atividades das enzimas relacionadas à assimilação de N. O critério de amostragem das variedades selecionadas para comporem os experimentos descritos nesse capítulo foi feito com base:

- Na caracterização genética das variedades pela análise molecular RAPD, escolhendo-se as que estavam em grupos diferentes (Capítulo 1);
- Pela diferença comportamental na absorção de N apresentada, entre as 16 variedades estudadas, elas foram analisadas em dois ensaios prévios realizados em casa de vegetação, com solução nutritiva, no Departamento de Solo-UFRRJ, conduzidos em dois períodos diferentes: - um no período frio, maio-junho de 1999, e o outro em no período quente, outubro-novembro de 2000 (dados não apresentados).

3.5.1 Localização e Condicionantes Ambientais.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, localizada no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 47, Seropédica, Itaguaí. Durante os períodos experimentais foram monitoradas as temperaturas máximas e mínimas diárias no interior da casa de vegetação (Anexo III), e a radiação na faixa dos comprimentos de onda fotossinteticamente ativa (400-700nm). A radiação foi medida no terço superior das plantas na casa de vegetação, com o objetivo de quantificar a porcentagem de radiação que estava passando para o interior da mesma; utilizou-se um radiômetro LI-COR modelo LI-185.

3.5.2 Obtenção do Material Vegetal.

Utilizou-se o delineamento experimental em blocos ao acaso, em esquema fatorial 5x2x2, com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelas combinações de cinco variedades de arroz (*Oryza sativa* L), e duas fontes de N (amoniaco e nítrico), e 2 doses de N (20 e 60 mg L⁻¹ de N). Sementes das variedades Lageado, IAC 47, Dobradinho, Agulha e Bico Ganga foram colocadas para germinar. Cinco dias após a germinação, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade e transplantadas para vasos com capacidade para 4 L contendo solução nutritiva a ¼ de força iônica (pH 6,0 ± 0,1,) (HOAGLAND & ARNON, 1950). Após um período de cinco dias, as plântulas foram novamente transplantadas para uma solução de crescimento a 1/2 de força iônica, e, decorridos mais cinco dias, as plantas foram novamente selecionadas e transferidas para solução de crescimento de 1 força iônica, utilizando-se quatro plantas por vaso. Esse procedimento foi feito para não causar choque salino, pois radículas de arroz são bastante sensíveis à concentração salina no meio de crescimento, visto que estas absorvem avidamente os nutrientes em solução (FURLANI E FURLANI, 1988).

Quando as plantas atingiram 42 dias de idade avaliaram-se os efeitos das formas e concentração de N sobre a cinética de absorção de N, a extrusão de prótons, sobre as enzimas de assimilação e sobre a partição de N nas plantas.

Nos dois experimentos, quarenta e duas horas antes do início do estudo da atividade enzimática, as plantas foram transferidas para vasos plásticos com 1 litro de solução de crescimento, desprovida de nitrogênio, visando aumentar a capacidade das

raízes em absorver este elemento (LEE & RUDGE, 1986). Após as quarenta e duas horas as plantas foram transferidas para uma solução nutritiva de pH $5,5 \pm 0,1$ com 20 ou 60 mg N/l nas formas de sulfato de amônio e nitrato de cálcio. Os demais nutrientes utilizados para o crescimento das plantas estavam a meia força iônica.

Tabela 2. Fonte e concentração dos nutrientes componentes da solução nutritiva de crescimento.

Elemento	Fonte	Concentração
	mg/l	
N-NH ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄	5
N-NO ₃	Ca(NO ₃) ₂	15
K	K ₂ SO ₄ .KH ₂ PO ₄	110
P	KH ₂ PO ₄	20
Ca	CaCl ₂	100
Mg	MgSO ₄ .7H ₂ O	30
S	MnSO ₄ .H ₂ O, ZnSO ₄ .7H ₂ O	96
B	H ₃ BO ₃	0,50
Mn	MnSO ₄ .H ₂ O	0,20
Cu	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02
Mo	H ₂ MoO ₄	0,05
Zn	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,20
Fe	FeC ₅ H ₆ O ₇ .5H ₂ O	2,00
Cl	CaCl ₂	106,00

Hoagland & Arnon, 1950.

3.5.3 Cinética de Absorção de Nitrogênio.

Em plantas de arroz de 42 dias de idade foram feitas determinações dos parâmetros cinéticos de absorção de NH₄⁺, K_M e V_{máx}, empregando-se o processo gráfico-matemático proposto por Ruiz (1985), baseado no método proposto por Claassen e Barber (1974), que se fundamenta na velocidade de esgotamento do íon na solução nutritiva. Através desse método é possível estabelecer a curva de absorção da quantidade (Q) do íon na solução com o tempo (t) de absorção por ajustes de função matemática aos dados experimentais.

Quarenta e duas horas antes do início do estudo da cinética de absorção de amônio, as plantas foram transferidas para vasos plásticos com 0,5 litro de solução de crescimento (Tabela 4), desprovida de nitrogênio, visando aumentar a capacidade das raízes em absorver este elemento (LEE E RUDGE, 1986). Após as quarenta e duas horas, as plantas foram transferidas para uma solução nutritiva de pH $6,0 \pm 0,1$ com 20 e 60 mgN/L na forma de sulfato de amônio e nitrato de cálcio e os demais nutrientes utilizados para o crescimento das plantas estavam a ¼ da força iônica.

As concentrações de nitrogênio utilizadas neste experimento permitem caracterizar a cinética de absorção de N em ambientes com variação na disponibilidade de N para as plantas, com o objetivo de verificar a diferenciação provavelmente existente entre genótipos de uma mesma espécie.

Foram feitas coletas a intervalos de 1 hora, nas quais, se retiraram alíquotas de 5 ml de solução, com a finalidade de se obter as curvas de absorção do íon amônio por um período de quatro horas após o início das coletas. Nos intervalos de tempo fez-se a determinação do pH da solução nutritiva, utilizando-se um mini pH metro da marca IMBRACRIOS modelo PM 603 para a caracterização do efluxo de prótons.

As concentrações de amônio foram determinadas pelo método de arraste de vapor sob MgO. O nitrato foi determinado por reação sulfossalicílica das amostras (CATALDO et al., 1975).

Com os dados obtidos, primeiro representou-se graficamente a quantidade de amônio na solução externa (Q) versus o tempo de amostragem (t), obtendo-se uma curva com diferenciação de 2 regiões. A seguir, na região de maior declividade da curva, escolheu-se, em seqüência ininterrupta, os pontos que melhor se ajustaram a uma reta determinando-se a equação de regressão linear:

$$C = a_1 + b_1 \quad (a)$$

Em que a_1 e b_1 são valores da interseção e declividade, respectivamente. Na região inicial da declividade da curva calcula-se $V_{m\acute{a}x}$, pela fórmula:

$$V_{m\acute{a}x} = \frac{a_1}{P_s}$$

Onde: I é o influxo ou velocidade de absorção ($\mu\text{mol/g.h}$).

3.5.4 Extrusão de Prótons

As concentrações de prótons foram calculadas levando-se em consideração que $\text{pH} = \log. 1/(\text{H}^+)$ no início e no final do trabalho, subtraindo-se as atividades iniciais e finais obtêm-se o incremento de H^+ na solução (extrusão de prótons).

3.5.5 Enzimas do Metabolismo de N

a) Extratos vegetais

Os extratos vegetais foram obtidos pela maceração de 1 g de folhas e de 1 g de raízes em N_2 líquido e mantidos em 4 ml de solução tampão compostas por imidazol – HCL 0,5 pH 5,0 para determinação de GS, GOGAT. Em seguida, foram submetidos a uma filtração em gase e papel de filtro, e o extrato foi recolhido em tubos de Ependorff os quais foram submetidos a uma centrifugação à 11500 rpm a 0°C por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nos ensaios enzimáticos. Para o ensaio da atividade de nitrato redutase pesou-se 200 mg de tecido vegetal fresco de raízes e parte aérea. O material vegetal colhido foi acondicionado em tubos de ensaio e submetido a um meio de incubação constituído de 5 ml da solução tampão de fosfato 0,1M a pH 7,5; n-propanol e KNO_3 . A temperatura de todas as vidrarias e soluções utilizadas durante os ensaios foi mantida abaixo de 4°C em banho de gelo.

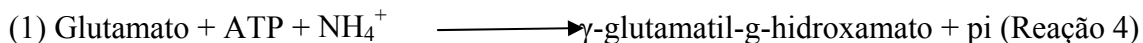
b) Ensaio de Nitrato Redutase (NR)

A atividade da NR foi determinada pelo protocolo de Jaworski (1971, citado por Souza, 1995) adicionando-se 4 mL da solução problema; 300 μL de sulfanilamida 1%; 300 μL de η -naftil-etilenodiamino 0,02% e a solução repousou por vinte minutos. Em seguida adicionou-se 4 mL de H_2O destilada, homogeneizou-se a solução e a leitura foi feita em espectrofotometro a 540 nm contra padrão de nitrito de sódio.

c) Ensaio de Glutamina Sintetase (GS)

Para o ensaio de GS utilizou-se o protocolo de Bergersen (1980, citado por Souza, 1995), modificado, adicionaram-se 300 μL do extrato vegetal a 500 μL de um coquetel de incubação constituído de 200 μL tampão imidazol-HCL 0,5M, pH 5,5; 100 μL de 2- β -mercaptoetanol, 100 μL de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4M; 100 μL de hidroxilamina;

100 µL de ATP; 100 µL de glutamato e 100 µL de H₂O. Incubou-se a mistura durante 30 minutos a 30° C, no final do período a reação foi paralisada pela adição de 1,5 mL de uma solução contendo cloreto férrico. Após trinta minutos, a mistura foi filtrada e o quelato Fe-γ-glutamil-g-hidroxiato (Reação 4) produzido na reação foi quantificado espectrofotometricamente a 540 nm contra padrão de γ-glutamil-g-hidroxiato.



d) Ensaio de Glutamato Sintase (GOGAT)

A atividade da GOGAT foi determinada pelo protocolo de Matoh et al., (1980), adicionando-se 100 µL do extrato vegetal bruto obtido a de um meio constituído de 150 µL de tampão TRIS-HCl 1M a pH 7,8; 200 µL glutamina 75mM; 200 µL de α-cetoglutarato. A reação teve início pelo acréscimo de 300 µL de NADH 1mM. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo na concentração do NADH nos tempos zero e quinze minutos após a adição deste produto, avaliado espectrofotometricamente a 340 nm.

e) Ensaio de Glutamato Desidrogenase Aminoação (GDH-A)

A atividade da GDH-aminoação (Bergersen, 1980, citado por Souza, 1995) foi determinada adicionando-se 100 µL do extrato vegetal bruto a um meio constituído de 300 µL tampão Tris-HCl 1 M a pH 8,0; 100 µL Na-α-cetoglutarato 0,33M; 100 µL de NH₄Cl 3M e 2,1ml de H₂O destilada. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 30° C, por quinze minutos, em seguida adicionou-se 300 µL de NADH 1mM e leu-se a absorbância neste exato momento. Após 10 minutos, fez-se o monitoramento da oxidação do NADH em 340 nm.

f) Ensaio de Glutamato Desidrogenase Deaminação (GDH-D)

A atividade da GDH-desaminação foi determinada através do protocolo de Bergersen (1980, citado por Souza, 1995), adicionando-se 100 µL do extrato vegetal bruto a um meio constituído de 300 µL tampão Tris-HCl a pH 9,4; 250 µL glutamato 0,6M e 300 µL de CaCl₂. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 30° C, por quinze minutos, em seguida adicionou-se 300 µL de NAD⁺ 1mM. Após 10 minutos, o monitoramento da redução do NAD⁺ foi realizado em 340 nm

3.5.6 Partição de N.

Determinou-se peso fresco e seco do sistema radicular e parte aérea, o volume radicular.

As frações solúveis foram extraídas pelo método de extração alcóolica conforme Fernandes (1978). O N-total foi determinado no material seco em estufa pelo método Kjeldahl. O N-amônio foi determinado pelo método da reação do íon amônio com fenol alcalino (FELKER, 1977). O nitrato foi determinado por reação sulfossilicídica das amostras (CATALDO et al., 1975). O N-amino foi obtido através de extração alcóolica conforme Fernandes (1978) e sua dosagem foi feita por colorimétrica pelo método da ninidrina (YEMM & COCKING 1955). Os açúcares solúveis foram determinados pelo método da antrona de Yemm & Wills (1954).

O N-protéico correspondeu ao N-total determinado no resíduo vegetal após a extração alcóolica (FERNANDES, 1974). Sua determinação foi feita por digestão sulfúrica, conforme Tedesco (1982).

3.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.6.1 Experimento 1: Efeito da Concentração e Forma de N Sobre a Extrusão de Prótons e Parâmetros Cinéticos de Absorção

a) Dados morfológicos

Na Tabela 2, pode-se observar que não houve diferença significativa quanto ao peso fresco e seco de parte aérea e raízes. As variedades Lageado e IAC-47 apresentaram os maiores valores de peso fresco e seco de parte aérea e raízes.

A relação raiz: parte aérea reflete a capacidade da planta desenvolver o sistema radicular em relação a parte aérea. A variedade IAC-47 apresentou menor relação raiz: parte aérea (Tabela 3). Esse resultado é pertinente com o tipo de pressão de seleção que essa variedade sofreu durante o melhoramento vegetal, visando maiores produções em altos níveis de nutrientes. A maior relação raiz: parte aérea foi constatada para a Lageado, indicando que aproximadamente 50% da fitomassa vegetal foi destinada ao desenvolvimento de raízes (Tabela 3). Esse fato é importante para escolha de genótipos eficientes na aquisição de N por plantas.

Em relação ao peso seco da parte aérea, as variedades Lageado, Agulha, IAC-47 e Dobradinho não apresentaram diferenças, em raízes os menores valores de peso seco foi para Agulha e IAC-47.

Tabela 3: Peso fresco e seco de folhas, caule e raízes de plantas de arroz, aos 42 DAG (médias de três repetições).

Peso Fresco (mg/g)	Variedades					CV %
	Lageado	Bico Ganga	Agulha	IAC-47	Dobradinho	
Parte Aérea	16,36 a	11,65 a	15,39 a	16,96 a	14,39 a	27,86
Raiz	8,35 a	3,67 c	4,58 b	4,98 b	6,27 ab	26,57
Rel. Raiz:P.aérea	0,51 a	0,41 ab	0,47 a	0,38 b	0,44 a	22,93

Peso Seco (mg/g)	Variedades					CV %
	Lageado	Bico Ganga	Agulha	IAC-47	Dobradinho	
Parte Aérea	4,60 a	3,22 a	4,57 a	5,36 a	4,26 a	13,92
Raiz	0,63 a	0,59 a	0,43 b	0,43 b	0,56 a	12,58

Médias acompanhadas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey a 5%

b) Efeito da concentração e forma de N sob o pH da solução

Nos tratamentos com N- NH_4^+ , observou-se elevação do pH da solução nutritiva nas primeiras horas do experimento para a variedade Lageado na dose de 20 mg N (Figura 2). Este mesmo efeito foi observado também no tratamento com 60 mg N- NH_4^+ /L, nas variedades Bico Ganga e Lageado, sendo mais prolongado na Lageado (duração de quase 72 horas - Figura 2). Provavelmente, o ato de transferir as plantas dos vasos com solução sem N, para os vasos com solução contendo os tratamentos, para o ensaio de cinética de absorção ocasionou estresse às plantas, principalmente às raízes, bloqueando a atividade das H^+ -ATPases. Aslam et al.(1996) observaram que o estresse físico bloqueava a extrusão de prótons, com reflexos no aumento de pH da solução.

Nas demais variedades, o pH da solução que recebeu N-amoniacal decresceu com o tempo de exposição do sistema radicular ao meio de cultivo. Observou-se também efeito da dose de N sobre a redução de pH da solução. Na solução com 60

mgN/L, observou-se o aumento da acidez do meio, para todas as variedades, indicando que a variação no pH da solução foi devida principalmente a forma de N disponível (Figura 2). Em geral, a nutrição amoniacal, tende a promover a acidificação do meio de cultivo (FERNANDES, 1978, FERNANDES & ROSSIELLO, 1995, FINDENEGG, 1987).

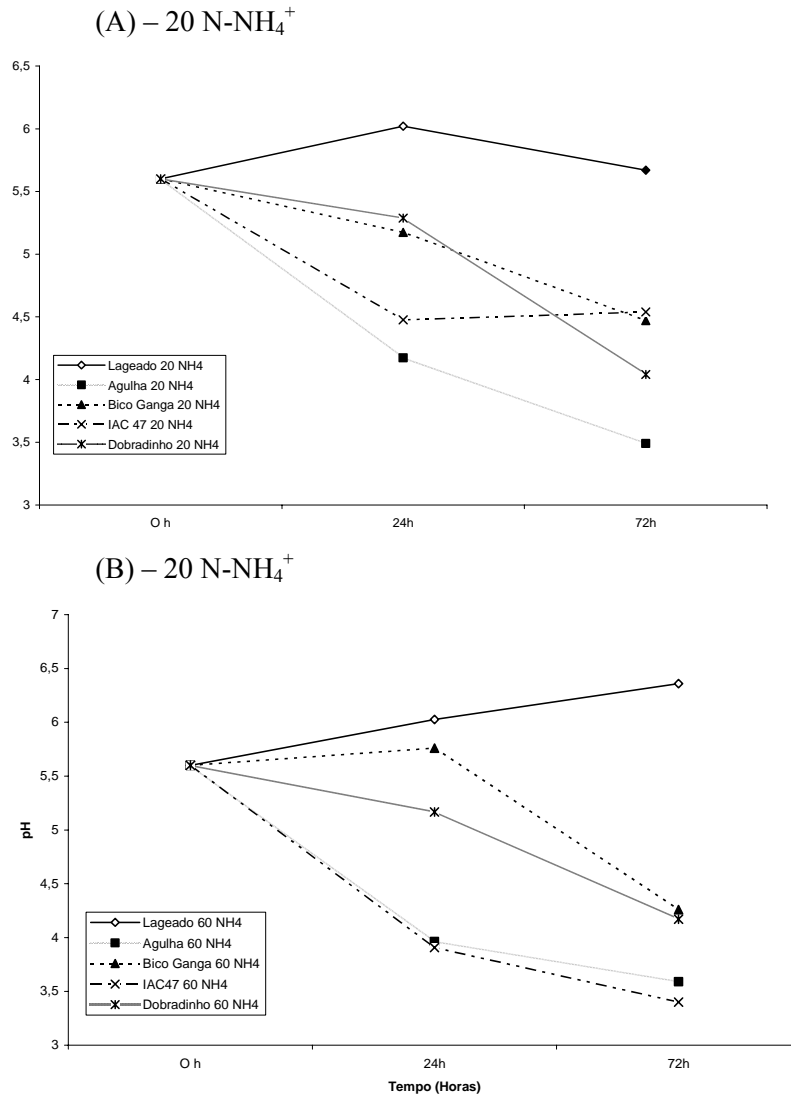


Figura 2A e 2B. Efeito da concentração de NH₄⁺ (20 e 60 mgN) sob a variação do pH da solução nutritiva, em plantas de arroz com 42 DAG.

Quanto à resposta a disponibilidade de N na forma N- NO₃⁻, observou-se alcalinização da solução nutritiva (Figura 3). Provavelmente, a alcalinização da solução externa foi devida ao consumo de H⁺ da solução utilizados para operar o sistema de transporte de NO₃⁻, presumivelmente um simporte de NO₃⁻/H⁺.

McClure et al. (1990) estudando a absorção de NO₃⁻, encontraram evidências da ação, em raízes de milho, de um sistema de cotransporte envolvendo NO₃⁻ e H⁺. Tais evidências foram apoiadas pela alcalinização do meio de cultivo. Os autores concluíram que a absorção de NO₃⁻ era pH dependente, pois a absorção foi em decorrência da depolarização seguida da hiperpolarização do potencial da membrana; foi inibida na presença de vanadato na solução (substância inibidora da ATPases) e foi dependente da concentração externa de NO₃⁻.

Os resultados observados na Figura 3, sugerem a possibilidade de estar havendo um influxo de H^+ simultaneamente com a absorção de NO_3^- , refletido no aumento de pH da solução nutritiva, independente das variedades em estudo. Esse fato poderia indicar a existência de cotransporte de NO_3^-/H^+ nessas variedades de arroz.

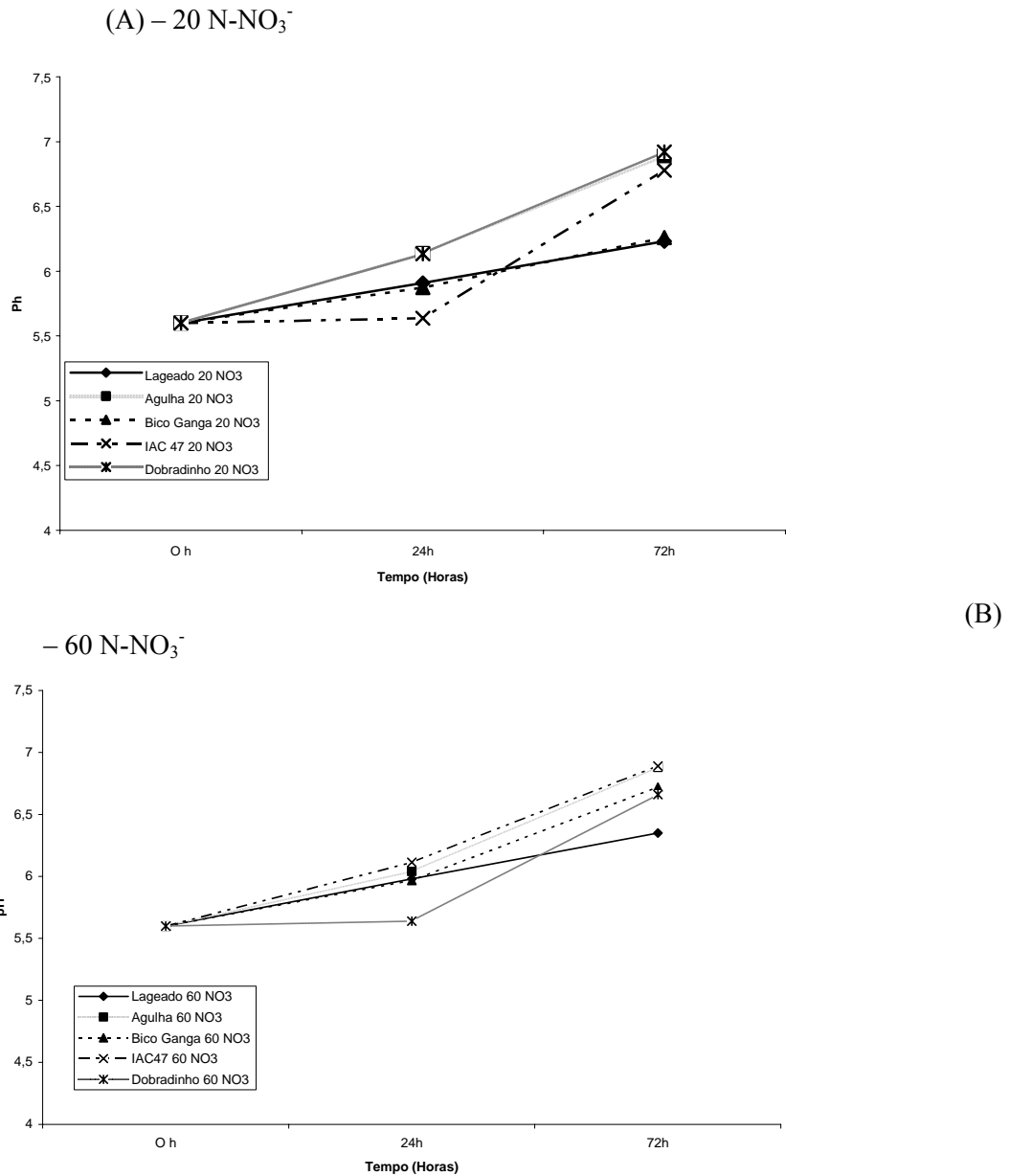


Figura 3A e 3B. Efeito da concentração de NO_3^- (20 e 60 mgN) sob a variação do pH da solução nutritiva, em plantas de arroz com 42 DAG.

Resultados semelhantes foram obtidos por McClure et al. (1990), que verificaram que plantas de milho supridas com $N-NO_3^-$ aumentaram o pH do solo, enquanto a fertilização com $N-NH_4^+$ resultou em redução do pH.

c) Efeito da concentração e forma de N sobre a extrusão H^+

A extrusão de prótons aumentou com o tempo de permanência das plantas em solução nutritiva com $N-NH_4^+$, em todas as variedades estudadas, com exceção da variedade Lageado (Tabela 4). Comparando o influxo de prótons, observou-se uma resposta diferencial das variedades, em ambos os níveis de $N-NH_4^+$ na solução. A variedade Agulha e a IAC 47 apresentaram curvas de absorção de N semelhantes, e apresentaram os maiores valores para extrusão de H^+ (Tabela.4).

Tabela 4. Extrusão de prótons (neq/g.pf.raiz.h) por raízes de arroz com 42 dias de idade submetidas à duas doses $N-NO_3^-$ em solução nutritiva.

Variedades	Extrusão H^+ (neq/g.pf.raiz. h)				
	Lageado	Bico Ganga	Agulha	IAC-47	Dobradinho
Doses N	Período 24 horas				
20 mgN- NH_4^+	9,20 c	693,97 b	1958,72 a	1049,25 ab	766,37 b
60 mgN- NH_4^+	-3,57 c	884,83 b	2044,40 a	2023,52 a	697,25 b
20 mgN- NO_3^-	-4,64 a	-5,57 a	-4,31 a	-4,64 a	-4,51 a
60 mgN- NO_3^-	-4,09 a	-6,52 a	-5,72 a	-4,73 a	-6,22 a

CV% = 17,74

Obs: O sinal negativo antes do valor significa influxo de H^+ através da plasmalema

Médias acompanhadas de letras iguais na mesma linha não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5%.

Com relação à resposta a nutrição nítrica, verificou-se que ocorreu influxo de H^+ em todas variedades (Tabela 4). As taxas de influxo de H^+ foram praticamente constantes entre as variedades, e parece que não sofreram efeito do aumento da dose de $N-NO_3^-$ no meio. Ao contrário, McClure et al. (1990) verificaram que altos níveis de NO_3^- no meio externo provocavam, simultaneamente, a alcalinização do meio e altas taxas de influxo de H^+ em milho.

3.6.2 Cinética de Absorção de N

a) Curvas de absorção de N

A curva de absorção expressa a quantidade de N absorvida pelo sistema radicular em função do tempo de exposição do mesmo ao meio nutritivo. Em geral, a inclinação da curva reflete a velocidade do processo de absorção (CLAASSEN & BARBER, 1974).

Analisando as figuras 4, 5, 6 e 7, observou-se que a absorção foi mais intensa nas primeiras duas horas do período experimental, independente das variedades, das formas e doses de N nas soluções. Esse fato poderia ser atribuído à omissão prévia de N da solução nutritiva por um período de 42 horas. Segundo Gazzarini et al (1999), a absorção de N aumentou quando plantas foram submetidas a um período de deficiência do nutriente, sendo a magnitude desse incremento função da concentração de N na solução e do genótipo.

As curvas de absorção de $N-NH_4^+$ na solução em função do tempo de exposição das plantas à solução, mostraram-se distintas em relação às variedades e às doses de N na solução (Figuras 4 e 5). Observou-se que a variedade Lageado foi a que menos absorveu o nitrogênio da solução. Provavelmente, o bloqueio da ATPase causado pelo estresse físico afetou a absorção de amônio (Figuras 4 e 5).

Na dose de 20 mg N-NH₄⁺/L (Figuras 4), a variedade Agulha apresentou uma curva de absorção com uma acentuada inclinação, indicando que esta variedade retirou maiores quantidade de N do meio e mais rapidamente. Fatos constatados em trabalhos anteriores por Baptista, et al., 2000. As curvas de absorção das demais variedades foram semelhantes.

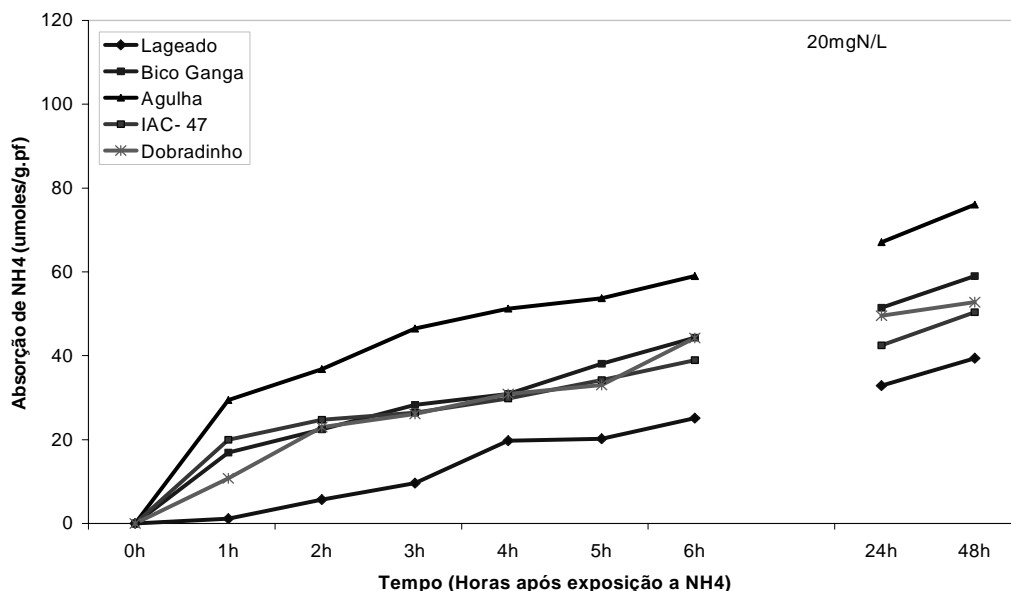


Figura 4. Curva de absorção de N-NH₄⁺ na solução nutritiva em função do tempo de exposição das plantas ao meio com 20 mgN/L.

Na dose de 60 mg N-NH₄⁺/L (Figuras 5), as variedades Agulha e IAC-47 apresentaram curvas de absorção, nas primeiras 24 do experimento, praticamente lineares durante todo o período experimental, e aparentemente não mostraram cinética de saturação. A atividade linear da cinética de absorção, verificada na concentração de 60 mg N/L, poderia ser, provavelmente, evidências da operação de um sistema de absorção de baixa-afinidade (LATS) pelo NH₄⁺. Nas variedades Lageado, Bico Ganga e Dobradinho a cinética apresenta saturação em relação à concentração de NH₄⁺ do meio externo, a partir da trigésima hora do período experimental. Este fato poderia ser indicativo da ação conjunta dos dois sistemas de transporte, o HATS e o LATS, nessas variedades. Investigações futuras devem ser conduzidas para esclarecer melhor a faixa de concentração de NH₄⁺ que delimita a ação desses transportadores nestas variedades.

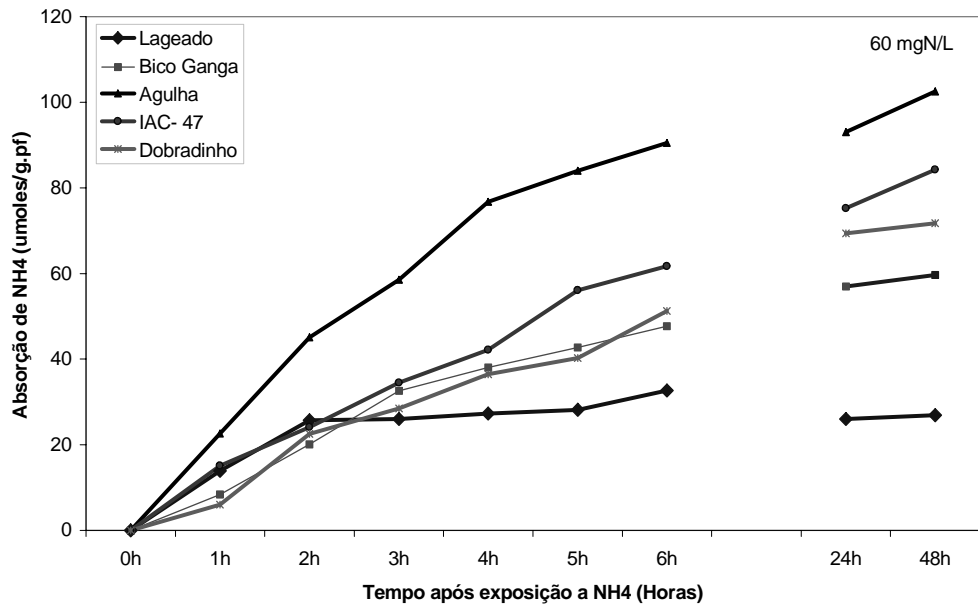


Figura 5. Curva de absorção de N-NH_4^+ na solução nutritiva em função do tempo de exposição de plantas de arroz ao meio com 60 mgN/L.

Na figura 6, podem-se verificar as curvas de absorção de N-NO_3^- na solução nutritiva na concentração de 20 mgN/L. As curvas apresentaram uma inclinação mais acentuada nas primeiras duas horas, e depois foram praticamente constantes.

Em comparação na concentração de 60 mgN- NO_3^- , observou-se que as curvas de absorção do NO_3^- foram mais acentuadas (Figura 7). Verificou-se que apesar de taxa de influxo de H^+ ter sido praticamente constante em função da dose de N, a aquisição de N-NO_3^- do meio aumentou. Esses resultados poderiam indicar que na concentração de 60 mgN- NO_3^- , além do sistema de cotransporte $\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$, estes resultados poderiam sugerir que a estequiometria do sistema de cotransporte pode ter regulação genótipo-específica diferente de $\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$ dependendo da variedade estudada. Segundo Grossman & Takahashi (2001) o transporte de NO_3^- em *Arabidopsis* é mediado por um simporte com relação estequiométrica da ordem de $1\text{NO}_3^-/2\text{H}^+$.

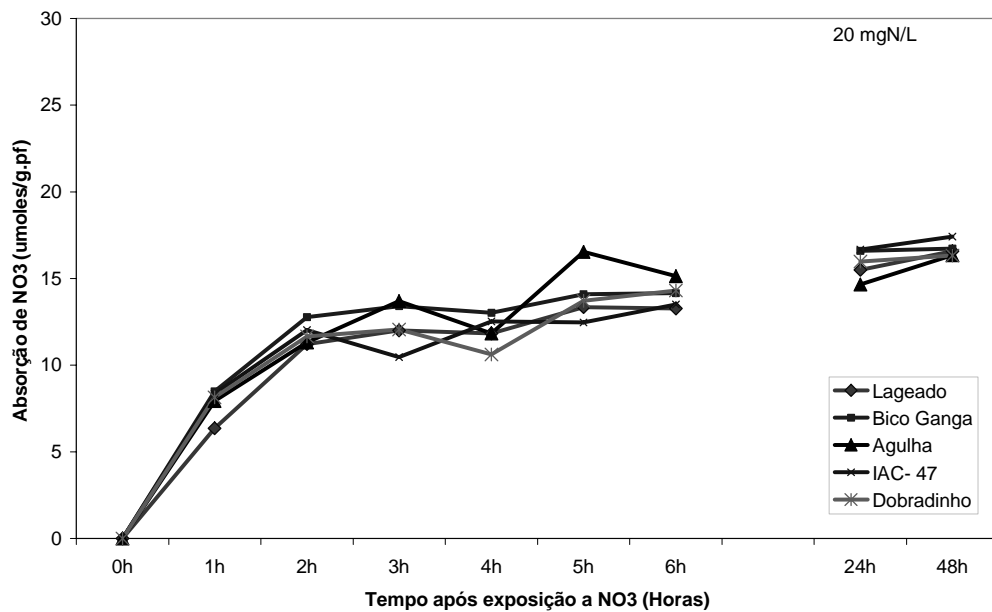


Figura 6. Curva de absorção de N-NO₃⁻ na solução nutritiva em função do tempo de exposição de plantas de arroz ao meio com 20 mgN/L.

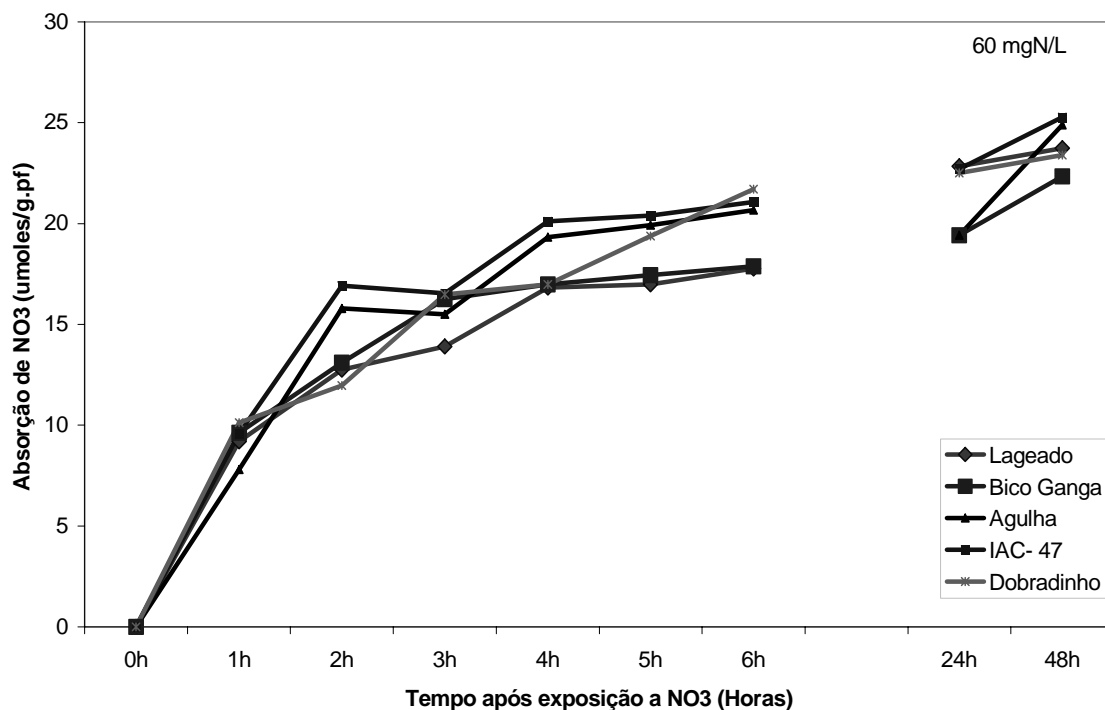


Figura 7. Curva de absorção de N-NO₃⁻ na solução nutritiva em função do tempo de exposição de plantas de arroz ao meio com 60 mgN/L.

Quanto à atividade cinética, as curvas de absorção referentes à concentração de 20mgN-NO₃⁻/L mostraram tendência à saturação com o substrato, nas variedades Bico ganga e Dobradinho indicando possivelmente a ação de um sistema de transporte de alta-afinidade (HATS). As demais variedades não apresentaram as curvas características de cinética de saturação com tempo de exposição. Provavelmente, estas curvas de absorção nestas variedades refletiram um modelo de absorção misto, no qual os dois sistemas de alta e baixa-afinidade estariam atuando, pela ação de um LATS. Filleur et al. (1996), contataram que os transportadores de NO₃⁻ do sistema LATS apresentavam

uma cinética de absorção bifásica, sugerindo que esses transportadores possuíam dupla afinidade pelo substrato.

Em análise das curvas de absorção, observa-se que existiram diferenças varietais quanto à capacidade de absorção do N da solução nutritiva.

b) Parâmetros cinéticos – V_{máx} e K_M

As características desejáveis dos parâmetros cinéticos de absorção são alta capacidade de absorção (alta V_{máx}) associada a uma alta afinidade pelo substrato (baixo K_M).

Nesse experimento, as correlações positivas encontradas entre K_M e V_{máx} ($r = 0,81$ e $r = 0,62$, (Tabela 7), nas concentrações de 20 e 60 mgN- NH₄⁺/L, respectivamente, indicam que (80 e 62%) os altos valores de V_{máx} foram associados a altos valores de K_M. Sugerindo que essas variedades não apresentaram nessas condições as características desejáveis de um genótipo eficiente na aquisição de NH₄⁺.

Quando a fonte de N fornecido na solução foi a nítrica, os coeficientes de correlação entre V_{máx} e K_M foram $r = 0,52$ e $r = -0,38$, para 20 e 60 mgN/L. Observa-se que em concentração com 60 mgN/L, 38% dos altos valores de V_{máx} foram associados a baixos valores de K_M.

Esses resultados podem ter sido consequência de dois fatos: (i) as variedades selecionadas possuíam baixa capacidade de aquisição de N (NH₄⁺ ou NO₃⁻) do meio nutritivo ou (ii) as concentrações testadas, nesse trabalho, estavam numa faixa os dois sistemas de transporte (alta e baixa-afinidade) estavam em atividade, simultaneamente.

Tabela 5: Valores médios de V_{máx}, K_M determinados em plantas de arroz aos 42 DAG, submetidas a solução nutritiva com N na forma amoniacal.

		V _{máx} (μmol/g.p.f.h ⁻¹)			
Doses N	Lageado	Bico Ganga	Agulha	IAC -47	Dobradinho
20 mgN-NH ₄ ⁺	9,05 a	25,95 a	29,44 a	20,43 a	12,11 a
60 mgN-NH ₄ ⁺	12,42 a	19,17 a	32,65a	25,46 a	16,40 a
20 mgN-NO ₃ ⁻	5,67 a	13,01 a	7,92 a	8,52 a	8,09 a
60 mgN-NO ₃ ⁻	8,22 a	14,73 a	17,98 a	19,81 a	10,05 a
		K _M (μmol/L)			
Doses N	Lageado	Bico Ganga	Agulha	IAC -47	Dobradinho
20 mgN-NH ₄ ⁺	25,55 a	37,22 a	50,00 ab	50,27 a	24,45 a
60 mgN-NH ₄ ⁺	71,67 a	43,34 a	116,76 a	48,70 a	31,10 a
20 mgN-NO ₃ ⁻	20,50 a	22,09 a	17,41b	18,71 a	18,06 a
60 mgN-NO ₃ ⁻	47,41 a	49,56 a	40,16 ab	49,35 a	52,09 a

Médias acompanhadas de letras iguais não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5%.

Na Tabela 5, nas concentrações de 20 e 60 mg N-NH₄⁺, observa-se que os maiores valores de V_{máx} foram apresentados pela variedade Agulha 29,44 e 32,65 μmol/g.p.f.h, respectivamente; e os menores valores de K_M foram apresentados pela variedade Dobradinho, 24,45 e 31,10 μmol/L, respectivamente. Nas concentrações de 20 e 60 mg N-NO₃⁻, as variedades Bico Ganga e IAC 47 apresentaram os maiores valores de V_{máx} foram de 13,01 e 19,81 μmol/g,pf, respectivamente; e a variedade Bico Ganga apresentou os menores valores de K_M 17,41 e 40,16 μmol/L, respectivamente (Tabela 5).

O estudo da cinética da absorção de N reflete o papel fisiológico da classificação dos sistemas de transporte baseada na afinidade do transportador pelo substrato. Significa, de maneira geral, a garantia de manter disponível a quantidade mínima necessária de N para o desenvolvimento vegetal. A alta-afinidade do sistema de

transporte é uma característica importante, mas que só assumi relevância fisiológica em condições ambientais em que há soluções diluídas do nutriente (EPSTEIN, 1975).

Portanto, os valores de K_M a serem considerados como parâmetro de eficiência de absorção seria somente aquele obtido nas concentrações de 20 mg N/L. As variedades Dobradinho e Lageado apresentaram valores de K_M de 24,45 e 25,55 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, quando a forma de N foi a amoniacal. As variedades Agulha, Dobradinho e IAC 47 apresentaram valores de K_M de 17,71, 18,06 e 18,71 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, quando a forma de N foi a nítrica (Tabela 4). Portanto, de acordo com essa teoria, essas variedades possuem habilidade potencial para aquisição de NH_4^+ e NO_3^- em condições de baixa disponibilidade destes íons no meio de cultivo.

Resultados semelhantes foram observados por Baptista (1995) para a variedade Agulha. Os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_M apresentados por agulha parecem indicar maior eficiência de absorção de nitrogênio nas quanto a formas de N e a nítrica, nas condições deste experimento.

Os parâmetros relativos a cinética de absorção são altamente variáveis, pois dependem do estado nutricional da planta, que por sua vez é afetada por fatores ambientais, tais como luz, temperatura e a propriedades físicas e químicas solo.

Analisando-se a variação dos parâmetros cinéticos em relação ao aumento da concentração de N no meio, observa-se que quando as plantas foram supridas com N-NH_4^+ , a $V_{\text{máx}}$ aumentou, aproximadamente 37, 26, 11, 25 e 35 % (percentual), e o K_M aumentou 180, 16, 133, 32 e 27 %, respectivamente para as variedades Lageado, Bico Ganga, Agulha, IAC 47 e Dobradinho. Resultados similares foram observados com relação a adubação a N-NO_3^- , observa-se que a $V_{\text{máx}}$ aumentou, aproximadamente 45, 13, 127, 132 e 18 %, e o K_M aumentou 130, 140, 130, 160 e 190 %, respectivamente para as variedades Lageado, Bico Ganga, Agulha, IAC 47 e Dobradinho. Apesar das variedades terem sido responsivas ao efeito do aumento da concentração de N, a diminuição da afinidade do sistema de transporte (aumento de K_M), fazem com que essas variedades sejam consideradas pouco eficientes na absorção de N nas condições testadas nesse trabalho.

Como os solos da região tropical, em geral possuem baixas concentrações de N, utilizar genótipos eficientes na absorção de fertilizantes nitrogenados significaria que pequenas adições de fertilizantes, garantiriam a sustentabilidade da rizicultura de sequeiro, além de respeitar o meio ambiente.

Em Arroz, Wang et al. (1993) em um estudo para avaliar a absorção de NH_4^+ , observaram que quando a concentração de NH_4^+ do meio era reduzida de 1 mM para 2 μM diminuía o K_M e aumentava a $V_{\text{máx}}$ (influxo máximo) do sistema de transporte. Os autores concluíram que as mudanças na capacidade do sistema de transporte envolvendo alterações na afinidade dos transportadores pelo NH_4^+ , é provavelmente, uma resposta adaptativa ao meio natural de desenvolvimento dos genótipos estudados.

Em relação aos sistemas de transporte, observa-se que a velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$) de absorção registrada para o LATS é geralmente superior é ao HATS, sugerindo que os mecanismos de regulação de um sistema é diferente do outro (LIU et al., 1999). Neste experimento as velocidades de absorção aumentaram em relação ao aumento de concentração de NO_3^- no meio externo.

Segundo Grossman & Takahashi (2001), os valores obtidos de K_M para os sistemas de transporte de amônio de alta e baixa-afinidade (HATS e LATS) em *Arabidopsis* foram em torno de 0,5 e 30-35 μM , respectivamente. Os valores de K_M , citados na literatura, para os sistemas de transporte de nitrato de alta e baixa-afinidade em *Arabidopsis* foram de 5-200 μM para o HATS e maiores que 0,5mM para o LATS (Grossman & Takahashi, 2001). Segundo Liu et al.(1999) a faixa de concentração de NO_3^- no meio que separa os sistemas de absorção em baixa e alta-afinidade (LATS e HATS) varia em torno de 0,5 a 1 mM, dependendo da espécie.

A faixa de concentração externa de nitrogênio utilizada nesse experimento (1,4 e 4,2 mM para amônio e 0,71 e 2,15 mM para nitrato), possivelmente, não permitiu isolar os efeitos dos sistemas de transporte de alta e baixa-afinidade, pois provavelmente dentro dessa faixa estejam operando os dois sistemas simultaneamente.

Outro fato que corrobora essa hipótese é que de acordo com os modelos das curvas de absorção de N em função do tempo de exposição das plantas à solução com os tratamentos (dados apresentados na seção anterior), observou-se que para ambos tratamentos (nitrato ou amoniacal), as curvas, de todas variedades, não apresentaram nem o modelo de saturação enzimática e nem o modelo linear, característica do sistema de alta e baixa-afinidade, respectivamente.

As curvas de absorção apresentadas nesse trabalho foram distintas de acordo com as variedades. A indefinição do modelo da curva de absorção poderia indicar que está ocorrendo a transição de um sistema para o outro, ou que os dois sistemas poderiam estar atuando simultaneamente. Se isso estiver acontecendo de fato, tanto os valores dos parâmetros cinéticos como os modelos das curvas apresentadas nessa faixa de concentração seriam a média das atividades dos sistemas de Transporte. Portanto, investigações futuras devem ser conduzidas para caracterizar em que faixas de concentração operam os sistemas de transporte de alta e baixa-afinidade de nitrato e de amônio em arroz.

Neste experimento não foi possível detectar o momento em que a quantidade de N passa a ser constante e a partir da qual a absorção de N cessa (C_{min}).

c) Influxo de N e extrusão de H^+

O influxo líquido de N é a diferença entre o influxo e o efluxo concomitante deste pelas membranas celulares. von Wirén et al. (2000) verificaram que o influxo líquido de NH_4^+ aumentava com o tempo de exposição das raízes no meio de cultivo e era dependente da concentração de NH_4^+ no meio externo.

Foram detectadas correlações positivas entre o influxo de NH_4^+ a extrusão de H^+ pelas raízes das variedades estudadas, nas concentrações de 20 e 60 mgN/l (Figura 8) obtiveram-se valores de $r = 0,75$ e $r = 0,87$, respectivamente.

Segundo Geredás et al. (1993) o influxo de absorção de amônio tende a diminuir em relação à redução do pH da solução como consequência da absorção de NH_4^+ . Parece que nestas condições, a eficiência da enzima H^+ -ATPase presente na plasmalema e responsável pela geração dos gradientes de prótons era bastante reduzida.

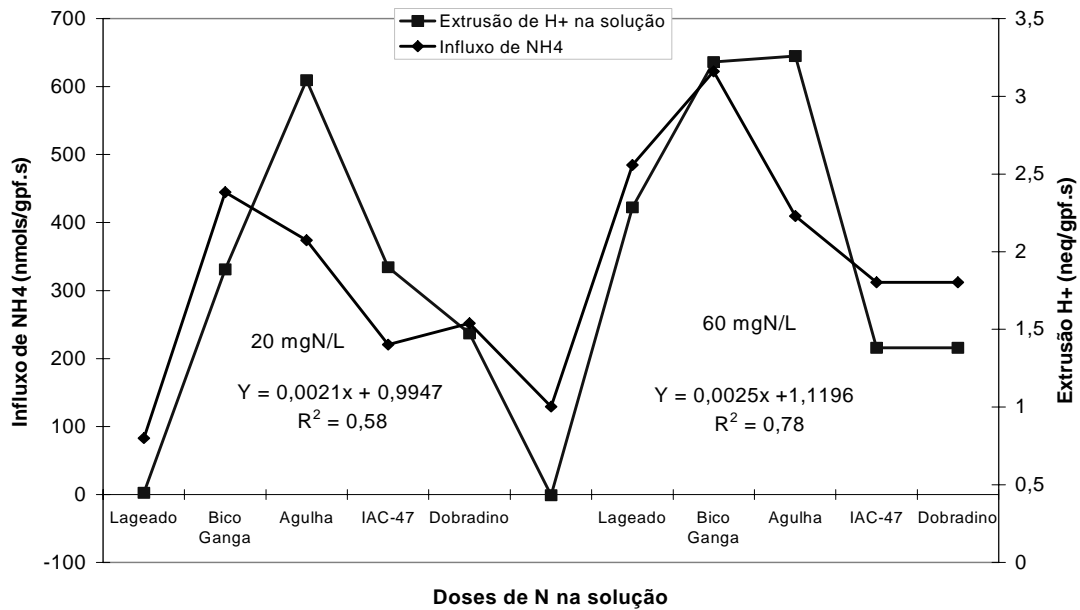


Figura 8. Influxo de NH_4^+ e extrusão de H^+ por plantas de arroz, com 42 DAG, submetidas a duas doses 20 e 60mg de N-amoniacal.

Foram detectadas correlações negativas, altamente significativas entre o influxo de NO_3^- a extrusão de H^+ pelas raízes das variedades estudadas, em ambas concentrações de N (Figura 9). Os valores obtidos foram: $r = 0,97$ e $r = 0,96$, respectivamente, para as concentrações de 20 e 60 mgN/L. Estes resultados corroboram a hipótese de estar ocorrendo, neste experimento, cotransporte de NO_3^- simultaneamente com influxo de H^+ através da plasmalema (GROSSMAN e TAKAHASHI, 2001; MACLURE et al., 1990).

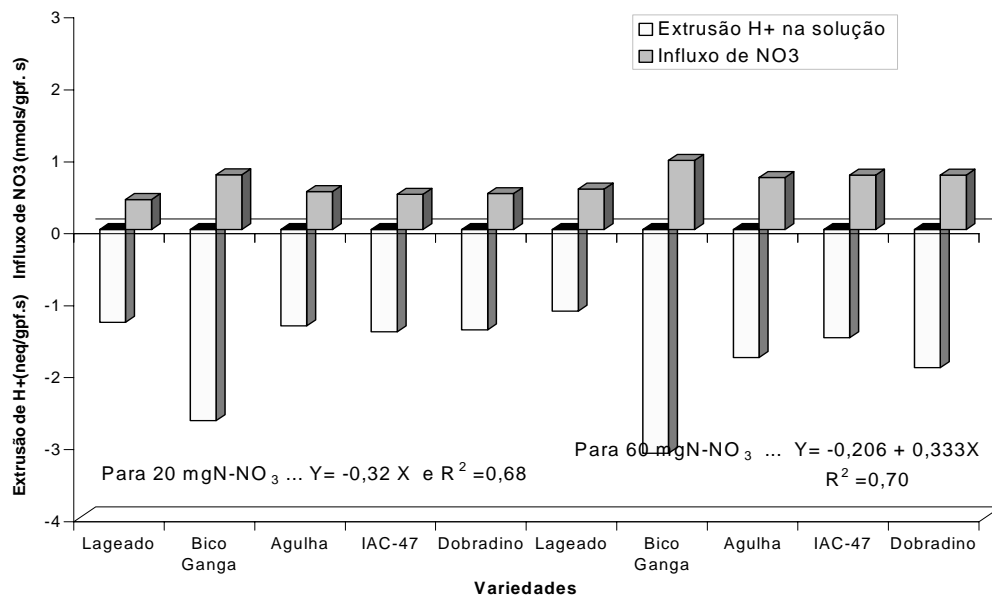


Figura 9. Influxo de NO_3^- e extrusão de H^+ por plantas de arroz, com 42 DAG, submetidas a duas doses 20 e 60mg de N-amoniacal.

Maiores influxos de amônio com relação a nitrato foram observados nesse trabalho (Figuras 8 e 9). Essa tendência, provavelmente, deve-se ao mecanismo de regulação da absorção de nitrato ser mais complexo e a evolução da espécie *Oryza sativa*, que nutricionalmente apresenta preferência pela forma amoniacal.

3.6.3 Partição de N em Plantas

a) N-NH₄⁺ nos tecidos vegetais

Os teores de NH₄⁺ livres nos tecidos de folhas e raízes foram significativamente diferentes. As variedades apresentaram acúmulo NH₄⁺ nas raízes, dependente da variedade e da dose de N no meio (Figura 10). Feng et al.(1998) observaram aumentos nos teores de NH₄⁺ no citossol de células de raízes, da ordem de 2 a 33 mM, quando plântulas de arroz eram expostas à doses crescentes de NH₄⁺ no meio externo. Segundo Howitt & Uldrevi (2000), a presença de altas concentrações de NH₄⁺ no citossol aciona o mecanismo de compartimentação do NH₄⁺. O amônio pode estar presente em todos os compartimentos da célula de folhas e raízes. Em compartimentos como o vacúolo, a concentração de amônio pode chegar a valores muito elevados. A compartimentalização do NH₄⁺ é um mecanismo fisiológico para evitar os efeitos danosos da presença de NH₄⁺ no citosol (HOWITT & UDVARDI, 2000).

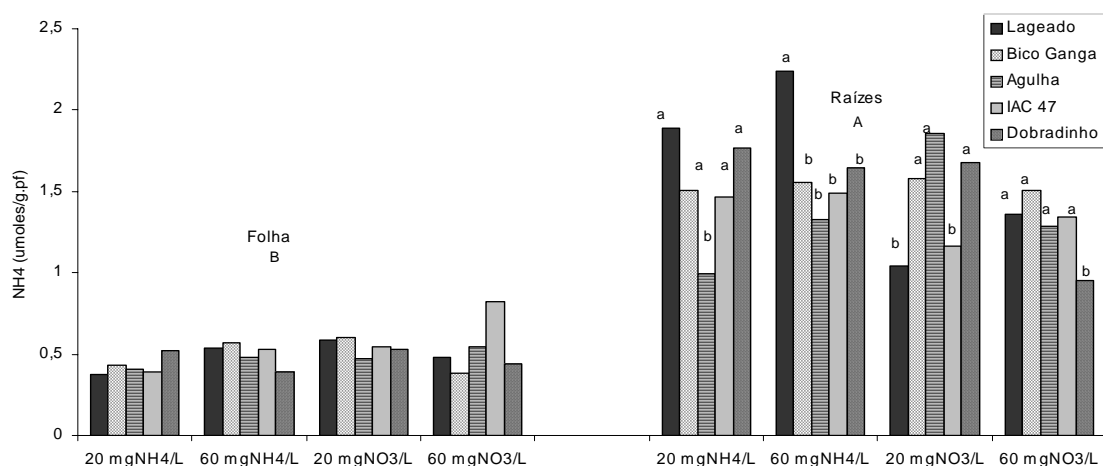


Figura 10. Concentração de NH₄⁺ em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de NH₄⁺ e N-NO₃⁻, em dois níveis 20 e 60 mgN/L.

Nas concentrações de 20 e 60 mg N-NH₄⁺/L, a variedade Agulha acumulou menores teores de NH₄⁺ nas raízes. Na concentração de 20 mg N-NO₃⁻/L, as variedades Agulha, Dobradinho e Bico Ganga apresentaram maiores valores de NH₄⁺ nas raízes. A variedade Dobradinho apresentou uma queda na concentração de NH₄⁺ nas raízes quando a concentração de NO₃⁻ aumentou no meio externo.

Neste experimento, foram observadas correlações negativas entre os teores de NH₄⁺ na planta e a absorção de N no tratamento amoniacal. Estes resultados estão de acordo com a literatura que menciona a regulação do influxo de NH₄⁺ pelo controle de retroalimentação negativo, no qual o sistema transportador sofre inibição pelo próprio substrato. Fato esse que corroborado pela alta correlação negativa entre os teores de NH₄⁺ nas raízes e o valor da V_{máx} (Tabela 7).

Observaram-se também correlações negativas entre as concentrações de NH₄⁺ nas raízes e as concentrações de aminoácidos nas raízes (r = -0,87) e açúcares

solúveis nas folhas ($r = -0,70$). Esses resultados indicam que os açúcares solúveis sintetizados nas folhas são translocados às raízes para serem utilizados no processo de assimilação de NH_4^+ . Segundo Aslam et al. (2001), plantas eficientes na absorção de N mantêm taxas fotossintéticas ativas altas durante o processo de assimilação de NH_4^+ .

b) N-NO_3^- nos tecidos vegetais

Os teores de NO_3^- nos tecidos foliares e radiculares podem ser observados na figura 11. Em folhas, não foram observadas diferenças significativas nos teores de NO_3^- , no tratamento de 20 mgN/L. Entretanto, quando houve aumento da concentração de NO_3^- no meio externo, ocorreu aumento significativo da concentração de NO_3^- nas variedades, sendo que a Bico Ganga aumentou mais que o dobro. A variedade Lageado apresentou queda significativa da concentração de NO_3^- nas folhas com o aumento de NO_3^- no meio.

Observou-se uma correlação positiva ($r = 0,33$) entre a $V_{\text{máx}}$ e os teores de NO_3^- solúvel de folhas no tratamento de 60 mg/L. todavia, os teores de NO_3^- em raízes do tratamento de 60 mgN/L mostraram correlação positiva com a $V_{\text{máx}}$. Resultados similares foram obtidos na concentração de 20 mgN/L. Correlações negativas entre a Velocidade máxima de absorção e a concentração de NO_3^- nas raízes significa que a velocidade do processo de absorção sofre regulação pela presença do substrato no meio celular. Resultados semelhantes foram obtidos por Aslam et al. (2001). Esses resultados sugerem que no mecanismo de regulação da absorção de NO_3^- , o próprio NO_3^- é um dos sinais promotores da inibição da absorção (retroalimentação).

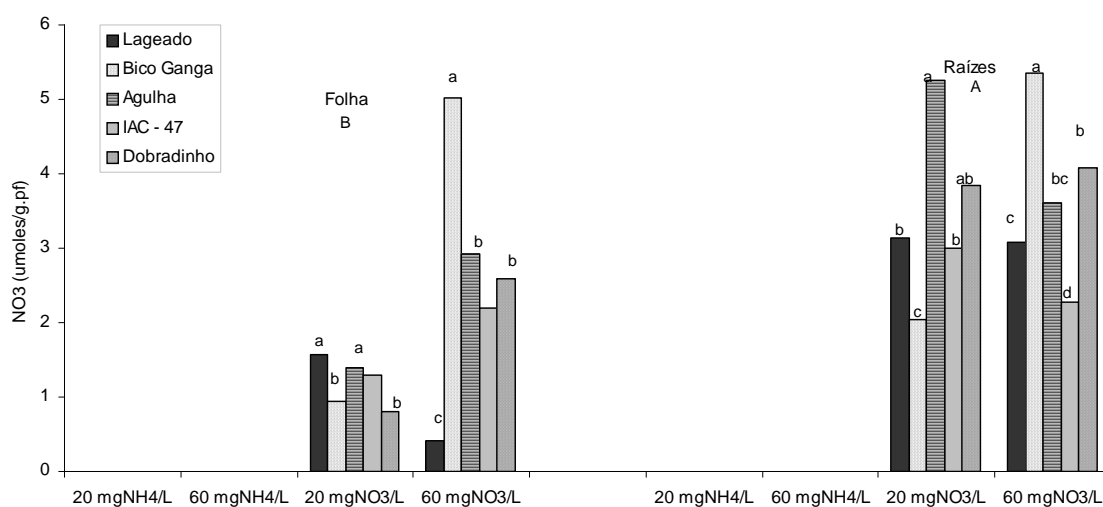


Figura 11. Concentração de NO_3^- em folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.

Observou-se uma ampla variação quanto aos teores de NO_3^- nas raízes, em ambas as concentrações (Figura 11). Estes resultados sugerem que as variedades possuem a capacidade de armazenar nitrato como mecanismo de sobrevivência. Hirel et al (2001) levantaram a hipótese que a habilidade de armazenar nitrato durante o crescimento vegetativo e remobilizá-lo durante a fase de floração e enchimento de grãos era característica positiva para maior produtividade e acúmulo de N grão.

c) Amino-N nos tecidos vegetais

Independente da forma de N utilizada nesse experimento, a variedade Agulha que recebeu 20 mgN apresentou maiores concentrações de aminoácidos nos tecidos (Figura 12).

Foram observadas correlações positivas entre os teores de Amino-N nas folhas e $V_{máx}$ de absorção de NO_3^- e de NH_4^+ . Os coeficientes correlações foram 0,64, 0,76, 0,59 e 0,47, respectivamente para os tratamentos de 20 e 60 mgN/L fornecidos na forma amoniacal e 60 mgN/L, na nítrica.

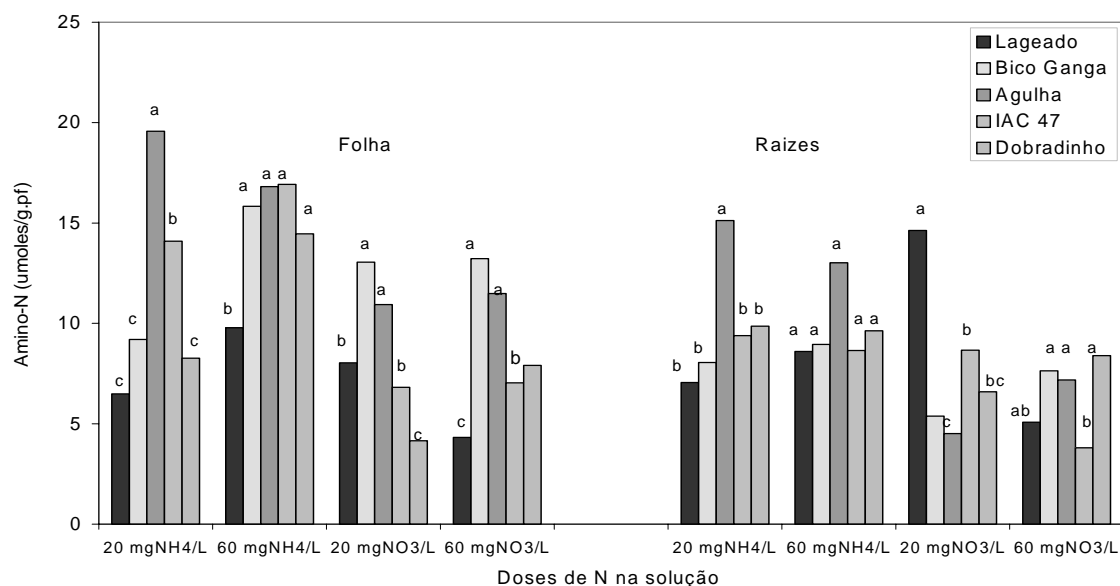


Figura 12. Concentração de amino-N em Folhas de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH_4^+ e N-NO_3^- , em dois níveis 20 e 60 mgN/L.

Neste experimento, aparentemente as concentrações de aminoácidos exercem controle sobre a regulação do influxo de N pelas raízes.

Resultados similares foram constatados por Aslam et al.(2001). Eles observaram que os aminoácidos inibiam parcialmente a atividade dos transportadores de NO_3^- do sistema HATS. Segundo os autores, glutamina e asparagina inibiam efetivamente o sistema, enquanto glutamato e aspartato pouca influenciavam. No sistema LATS os teores de glutamina e asparagina exerceram pouca influência.

d) Açúcares solúveis nos tecidos vegetais

Em relação aos teores de açúcares solúveis, observa-se na Figura 13, que estes foram superior na parte aérea quando comparados com os teores de raízes. Nas raízes, não foram constatadas diferenças significativas entre as concentrações de N e nem entre as variedades dentro de cada concentração testada.

Nas folhas não foram detectadas diferenças significativas dos teores de açúcares solúveis em relação à concentração de N no meio (Figuras 13).

Como resposta ao aumento da concentração de N no meio de cultivo, as plantas de todas as variedades estudadas tenderam a aumentar a taxa fotossintética, sendo a mais responsiva a variedade Agulha, seguida da Dobradinho.

Aparentemente, esse efeito foi maior nos tratamentos nítricos do que nos amoniacais. Pode-se admitir que esses resultados indicam uma característica positiva

dessas variedades, pois mostram a capacidade de suprir a demanda energética do processo de redução do nitrato absorvido.

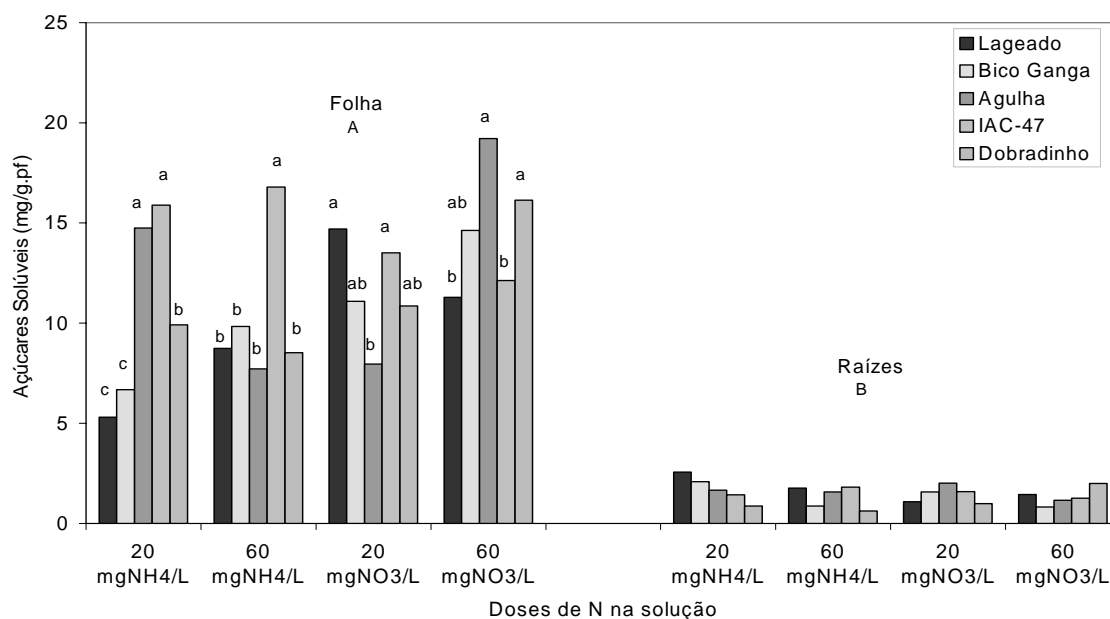


Figura 13. Concentração de açúcares solúveis em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de $N-NH_4^+$ e $N-NO_3^-$, em dois níveis 20 e 60 mg N/L.

A baixa correlação entre os valores da $V_{máx}$ e as concentrações de açúcares solúveis nas raízes, chegando a atingir valores negativos na concentração de 60 mg $N-NO_3^-/L$ ($r = -0,55$), corrobora a hipótese que nas faixas de concentração de nitrogênio usadas nesse experimento, o sistema de transporte seja provavelmente um LATS (baixa-afinidade). Segundo William & Miller (2001) e Howitt & Uldrevit (2001), a atividade do sistema de transporte de alta-afinidade é dependente de energia metabólica.

3.6.4 Experimento 2: Efeito da Concentração e Forma de N Sobre a Eficiência na Absorção e Assimilação de Nitrogênio.

a) Dados morfológicos

Não foram detectadas diferenças significativas para peso seco e relação raiz: parte aérea nas variedades estudadas (Tabela 6). Em relação ao valor de peso fresco de caule, a variedade Bico Ganga foi significativamente menor. Não era esperado que houvesse efeito das doses de N sobre esses parâmetros, pois durante toda a fase de crescimento, as plantas receberam as mesmas condições para o desenvolvimento, em casa de vegetação. Se aparece alguma diferença, essa seria entre as variedades, provavelmente efeito de variação genotípica.

Tabela 6: Peso fresco e seco de folhas, caule e raízes de plantas de arroz, aos 42 DAG (média de 3 repetições).

Variedades	PESO FRESCO (mg/g)			Relação
	Folha	Caule	Raiz	Raiz:p. aérea
Lageado	6,16 a	12,79 a	6,77 a	1,10 a
Bico Ganga	4,79 a	6,88 ab	3,36 a	0,73 a
Agulha	6,31 a	11,95 a	5,15 a	0,83 a
IAC-47	6,70 a	12,41 a	5,03 a	0,81 a
Dobradinho	5,47 a	11,09 a	5,18 a	1,25 a
CV%	29,38	30,11	29,01	29,11

Variedades	PESO SECO (mg/g)		
	Folha	Caule	Raiz
Lageado	2,49 a	2,86 a	0,90 a
Bico Ganga	2,74 a	2,74 a	1,20 a
Agulha	2,9 a	2,47 a	1,15 a
IAC-47	2,88 a	2,55 a	1,20 a
Dobradinho	2,55 a	2,26 a	0,95 a
CV%	11,10	17,87	14,56

Médias acompanhadas de letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente pelo Teste de Tukey a 5%.

Observa-se, na tabela 6, que a variedade Bico Ganga apresentou menor relação raiz/parte aérea. Entretanto em relação ao peso seco de raiz, essa variedade apresentou o maior valor. Provavelmente, esse resultado está associado ao fato dessa variedade possuir uma característica peculiar, provavelmente de natureza genotípica, de emissão de grandes quantidades de pêlos radiculares. Essa característica foi mencionada em trabalhos anteriores por Baptista et al. (2000).

O sistema radicular da variedade Bico Ganga é formado por um grande número de raízes finas, todavia ele não apresenta variação no comprimento das raízes em comparação as demais variedades (Figura 14).



Figura 14: Raízes das variedades Agulha, Lageado, Bico Ganga e IAC 47, aos 5 dias após a germinação.

Em condições de solos com baixa fertilidade (regiões tropicais), a densidade de pêlos radiculares poderia ser um fator importante, visto que uma maior área de solos poderia ser explorada, aumentando a absorção de nutrientes.

3.6.5 Partição de N em plantas

a) N-NH₄⁺ nos tecidos vegetais

Foram detectadas diferenças significativas entre os teores de NH₄⁺ nos tecidos foliares e radiculares (Figura 15).

As variações nos teores de NH₄⁺ de folhas sofreram maiores alterações pelo efeito da concentração de N no meio, independente da forma. Observa-se na figura 15 que os tratamentos com 20 mgN/L provocaram maiores variações nos teores de NH₄⁺.

Em raízes, observa-se um comportamento distinto das variedades em acumular NH₄⁺. A variedade Dobradinho foi a que menos acumulou amônio nas raízes.

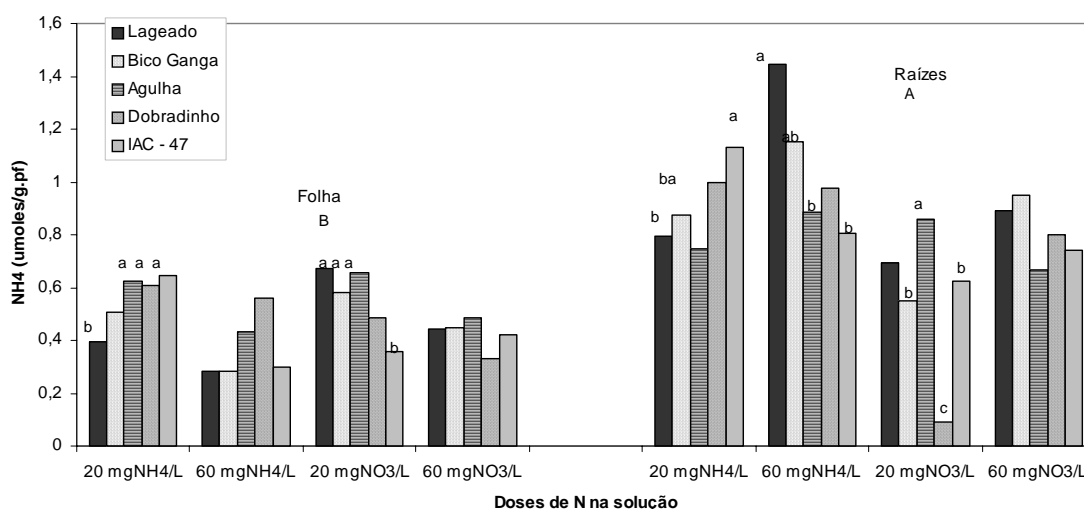


Figura 15. Concentração de NH₄⁺ em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, em dois níveis 20 e 60 mgN/L.

b) N-NO₃⁻ nos tecidos vegetais

Os teores de NO₃⁻ nos tecidos foliares e radiculares podem ser observados na figura 11. Não foram detectadas diferenças significativas para os teores de NO₃⁻ em folhas, no tratamento de 20 mgN/L. Em relação à concentrações de 60mgN/L de solução, observou-se que a variedade Bico Ganga apresentou os maiores teores de NO₃⁻, enquanto a variedade Lageado apresentou os menores teores.

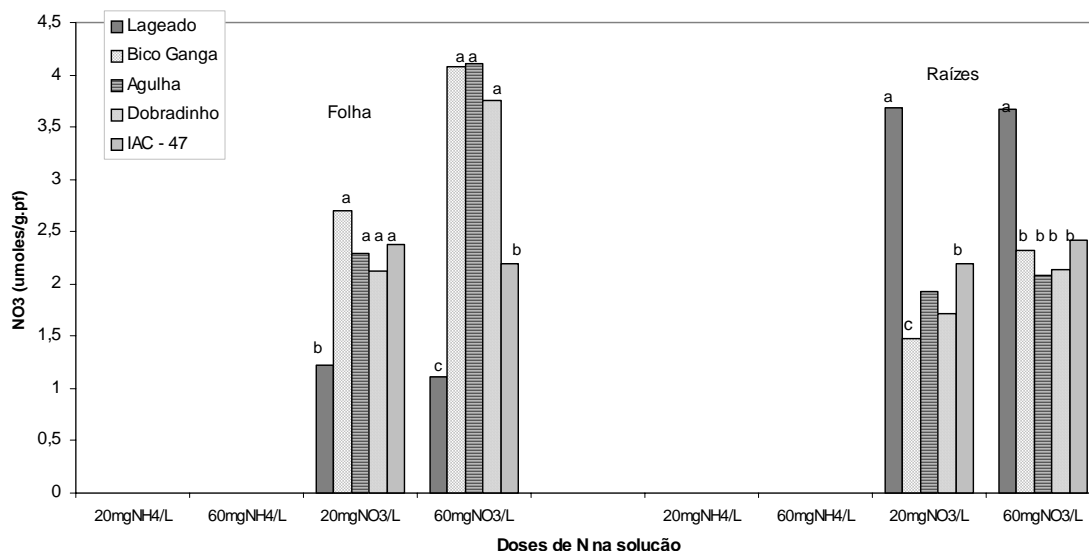


Figura 16. Concentração de NO₃⁻ em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, em dois níveis 20 e 60 mgN/L.

c) Amino-N nos tecidos vegetais

Na Figura 17, verificou-se que os teores de amino-N livres apresentaram uma grande variação em tecidos de raízes e de folhas. Parece que a habilidade de assimilação de N é influenciada pela concentração de N no meio, pela forma iônica disponível e pela variabilidade genética de cada variedades.

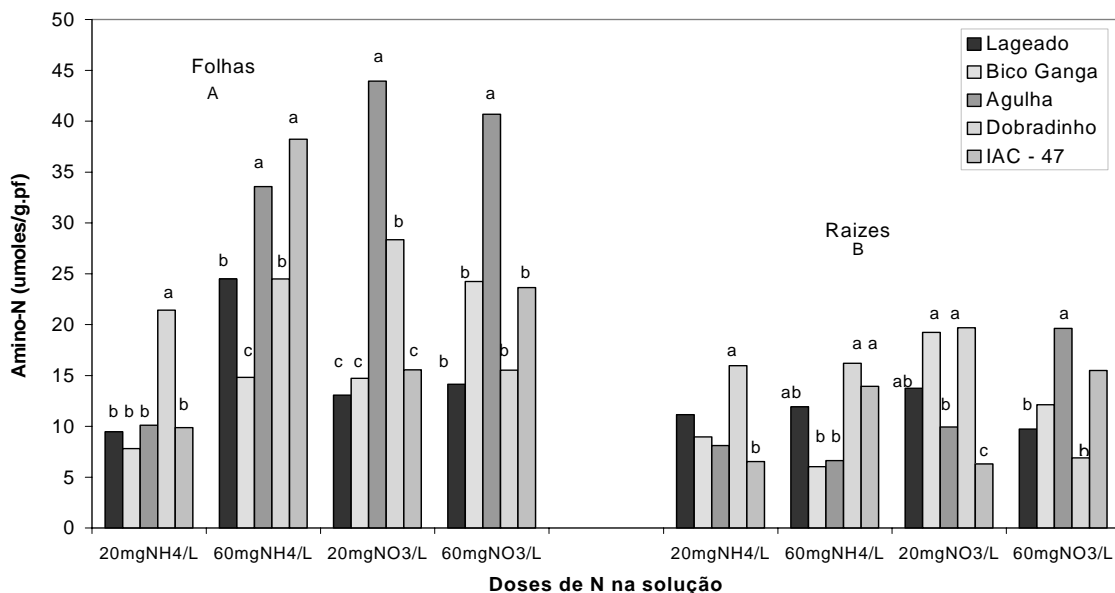


Figura 17. Concentração de amino-N em Folhas de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, em dois níveis 20 e 60 mgN/L.

d) Açúcares solúveis nos tecidos vegetais

Em relação aos teores de açúcares solúveis, observa-se na Figura 18, que estes foram significativamente maiores na parte aérea quando comparados com os teores de

raízes. Em raízes, só foram constatadas diferenças significativas dentro da concentração 20mgN/L de N-amoniacal.

Nas folhas não foram detectadas diferenças significativas em relação à concentração de N no meio, mas houve diferença significativa entre as variedades dentro de cada concentração testada (Figura 18).

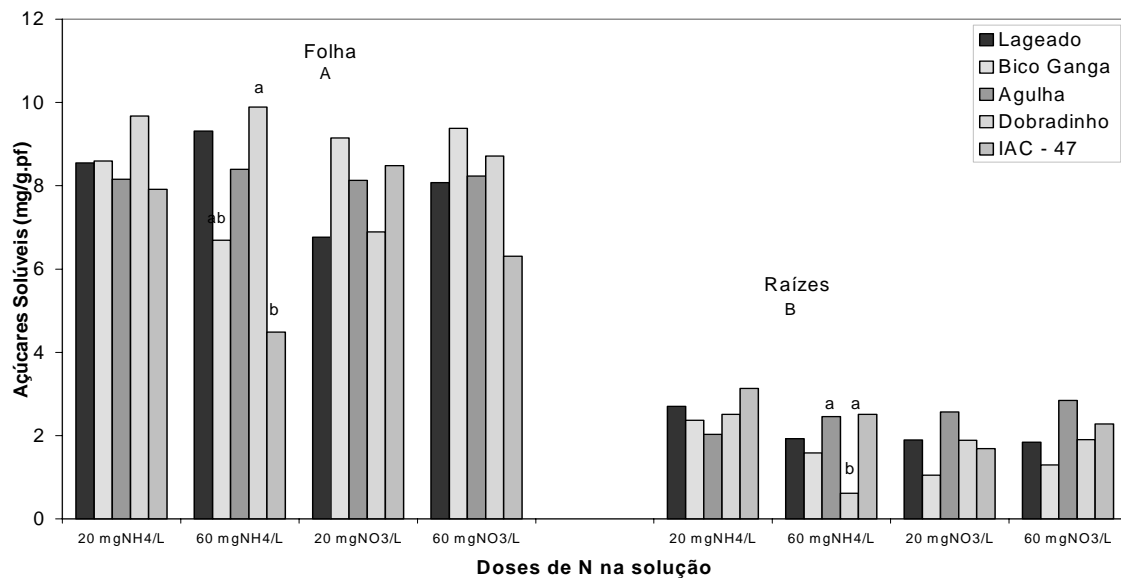


Figura 18. Concentração de açúcares solúveis em Folhas e raízes de arroz com 42 DAG submetidas as formas de N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻, em dois níveis 20 e 60 mgN/L.

Os maiores teores de açúcares solúveis em folhas foram apresentados pela Variedade Dobradinho e Bico Ganga.

3.6.6 Metabolismo de N

a) Atividade de NR

A atividade de Nitrato redutase (NR) aumentou com a elevação da disponibilidade de N no meio (Figura 19). Como era esperada, a atividade da NR foi nula nos tratamentos com N- NH₄⁺, uma vez que esta enzima é induzida pelo substrato (nitrato) (ASLAM et al., 2001; GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001).

A redução do nitrato ocorreu em folhas e raízes, simultaneamente. Porém, apresentado uma tendência a ser maior no sistema radicular. No tratamento com 20 mgN na forma nítrica, a variedade Agulha mostrou ser bastante responsiva ao aumento de NO₃⁻ no meio, tendo aumentado sensivelmente a atividade de NR nas raízes (Figura 20).

Estes resultados parecem estar pertinentes com dados da literatura que associaram aumentos da atividade de NR a altos níveis de NO₃⁻ na solução (Aslam et al., 2001; Pereira-Neto et al., 1989). Segundo Aslam et al.(2001), em geral, a indução da NR é feita pelo substrato (NO₃⁻) e a inibição ou repressão por produtos originados do processo de absorção de NO₃⁻ e assimilação do N reduzido, tais como NO₃⁻, NH₄⁺, e aminoácidos livres.

Segundo Traore & Maranville (1999), o efeito da concentração de NO₃⁻ no meio externo na atividade de NR é um parâmetro importante quando se estar analisado o comportamento de um determinado genótipo em relação a doses crescentes de NO₃⁻.

Porém, quando o estudo envolve a avaliação de vários genótipos, o fator variabilidade genotípica passa a ser determinante na avaliação.

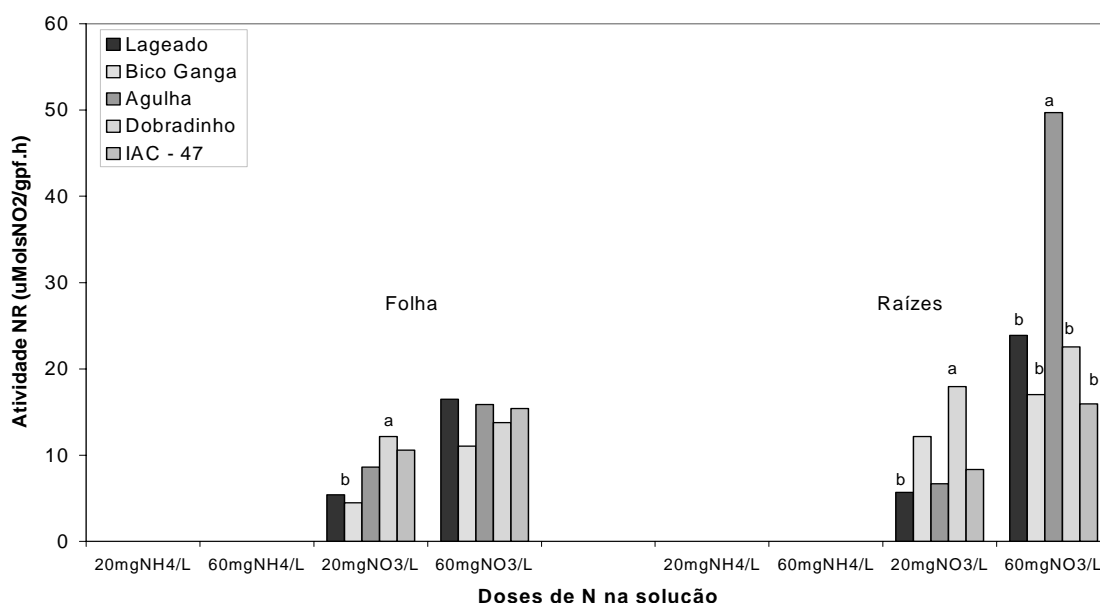


Figura 19. Atividade de NR em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.

Foram observadas correlações negativas entre os teores de NH_4^+ nas raízes e a atividade de NR no tratamento de 20 mgN/L, e não foi constatada correlação no tratamento de 60 mgN/L. De acordo com Feng et al (1998), o aumento da concentração de N (independente da forma que este se encontre na solução externa) ativa os sistemas de compartimentação dos produtos oriundos da redução NO_3^- e assimilação de NH_4^+ , que se caracteriza pela retirada destes produtos do citoplasma para o apoplasto, o vacúolo, ou outra organela celular.

É provável, que no tratamento de 60 mgN/L utilizado neste experimento possa ter acionado os sistemas de compartimentalização de NH_4^+ , e por isso os teores de NH_4^+ , em raízes, não afetaram a atividade de NR que está localizada no citosol.

Aparentemente, os teores de NO_3^- e de aminoácidos nos tecidos não afetaram diretamente a atividade de NR (Figuras 16 e 17).

É interessante que a atividade de NR em folhas observada neste experimento. Primeiro porque a redução é dependente de energia metabólica, segundo por que o sistema de transporte de NO_3^- para folhas parece sido eficiente nestas variedades, o que poderia ser um indício de eficiência de redução de nitrato, visto que esta está sendo feita nos dois tecidos. Lemos et al. (1999) verificaram que plantas de seringueira só reduziam o nitrato em células de raízes e o N reduzido, era então, transportado para a parte aérea.

b) Atividade de GS

Nas variedades estudadas observou-se que a atividade da GS foi predominante nas folhas, em comparação com as raízes, independente da dose e da forma de N disponível (nitrato ou amônio) (Figura 20).

Segundo Grossman.& Takahashi (2001), existem nas folhas duas isoformas de GS, uma conhecida como GS1, presente no citosol e outra, GS2, presente nos cloroplastos. O papel da GS2 é assimilar o amônio produzido a partir da redução do

NO_3^- , enquanto o da GS1, aparentemente está ligado a respostas a alta concentração de NH_4^+ no citossol.

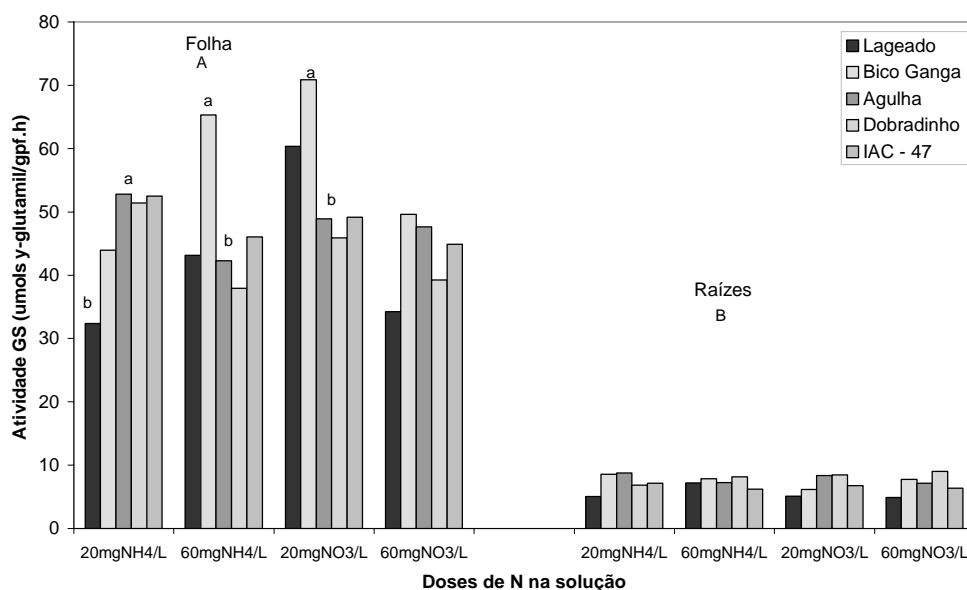


Figura 20. Atividade de GS em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.

Nas folhas, dentro de cada tratamento, observou-se que as variedades eram responsivas à concentração de N (Figuras 20). No tratamento com amônio, na concentração de 20 mgN/L, a variedade Lageado apresentou atividade de GS significativamente inferior à apresentada pelas demais variedades. A variedade Bico Ganga apresentou valores de atividade de GS superiores ao nível de probabilidade de 5% , nos tratamentos de 20 e 60 mgN/L, na forma nítrica e amoniacal, respectivamente (Figura 20).

Pode-se observar que a atividade de GS em raízes e folhas não foi afetada pelo aumento da concentração de N no meio (Figura 20). O efeito do aumento das concentrações de N sobre a atividade de GS, em raízes, poderia estar sendo mascarado pelo fato destas plantas terem permanecido 42 horas em solução desprovida de N (simulação do ensaio de cinética). Ao contrario, Mäck (1995) observou aumentos de níveis da isoformas de GS citossólica (GS1a e GS1b) e da isoforma cloroplásticas (GS2) em raízes e folhas de plantas de arroz crescidas sob diferentes fontes de N. Eles observaram também que a atividade de GS aumentou em função das doses crescentes de N na solução.

De acordo com Kronzucker et al. (1998) o período de privação de N na solução nutritiva aumenta a atividade de GS. Portanto, como as variedades de arroz sofreram prévia privação de N, antes de receberem os tratamentos com nitrato e amônio, observou-se que os processos de absorção e assimilação de N sofrem alterações de maneira a compensar a deficiência de N, conseqüentemente, o influxo de N é aumentado e os processos de assimilação de N são otimizados nas plantas. É por esta razão que se recomenda para os ensaios de cinética de absorção, nos quais se deseja verificar o influxo máximo (que o sistema de transporte poderia atingir em determinada situação), que as plantas fiquem previamente sem o nutriente por um certo período de tempo (GAZZARINI et al., 1999).

A atividade de GS apresentou correlação negativa (Tabela 7 e 7) com os teores de NH_4^+ nos tecidos radiculares, no tratamento de 20 mgN/L. Este resultado poderia

indicar que o NH_4^+ absorvido ou o NH_4^+ gerado pela redução de NO_3^- está sendo carregado para as folhas para ser assimilado. Investigando a dinâmica do fluxo de N entre as raízes e a parte aérea em plantas de arroz, Kronzucker et al. (1998) constataram que plantas re-expostas à solução com N, o fluxo de NH_4^+ da raiz para a parte aérea começou nos primeiros 30 minutos, sofrendo repressão depois de cinco horas de exposição das raízes à solução com N. Os autores observaram também que este fluxo aumentou 70% em relação ao controle (plantas que não passaram por um período de privação de N).

Observou-se correlação positiva (tabela 7 e 8) entre os teores de NO_3^- em folhas e a atividade de GS, em ambos os tratamentos nos quais a forma de N era a nítrica. Nas folhas os fatores necessários para a atividade de GS estão em abundância (agente redutor, ATP e esqueletos de carbono). Portanto, estes resultados poderiam sugerir que o NO_3^- reduzido é prontamente assimilado em compostos orgânicos.

Houve correlação altamente significativa ($r = 0,97$) entre atividade da GS e teores de açúcares solúveis neste experimento. Grossman & Takahashi (2001) relataram que aumentos nos teores de açúcares solúveis aumentam os níveis de transcritos dos genes de GS. De acordo com os autores, em geral, a regulação metabólica da expressão de GS em plantas está associada à relativa abundância de esqueletos de carbonos, e está diretamente correlacionada à absorção de NO_3^- e NH_4^+ e a assimilação de NH_4^+ . A correlação positiva entre GS e teores de açúcares solúveis está em consonância com dados da literatura (FENG et al., 1998, GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001; WILLIAM & MILLER, 2000, CORRUIZZI & ZHOU, 2001).

c) Atividade de GOGAT

A atividade de GOGAT foi predominante nas folhas das variedades estudadas, independente dos tratamentos (Figura 25). Observou-se que ocorreu diferença varietal na atividade da GOGAT dentro dos tratamentos.

O tratamento de 60 mgN/L de N- NH_4^+ estimulou a atividade de GOGAT nas folhas da Variedade Bico Ganga e Lageado. O tratamento de 60 mgN/L de N- NO_3^- aumentou a atividade de GOGAT em folhas da variedade Agulha.

As atividades de GOGAT apresentaram correlação positiva (valor de $R = \dots$) em relação aos teores de açúcares solúveis e negativa com os teores de NH_4^+ ($R = \dots$). Segundo Grossman & Takahashi (2001), os genes responsáveis pela expressão de GOGAT (Glu1 e Glu2) são controlados pelos teores de NO_3^- e pela luz. Parece que a indução da atividade dessa enzima pelo NO_3^- envolve a presença de cálcio e citocinina em raízes. Portanto, o efeito de NO_3^- sob a atividade de GOGAT, pode dar-se de forma indireta, muitas vezes não sendo detectado.

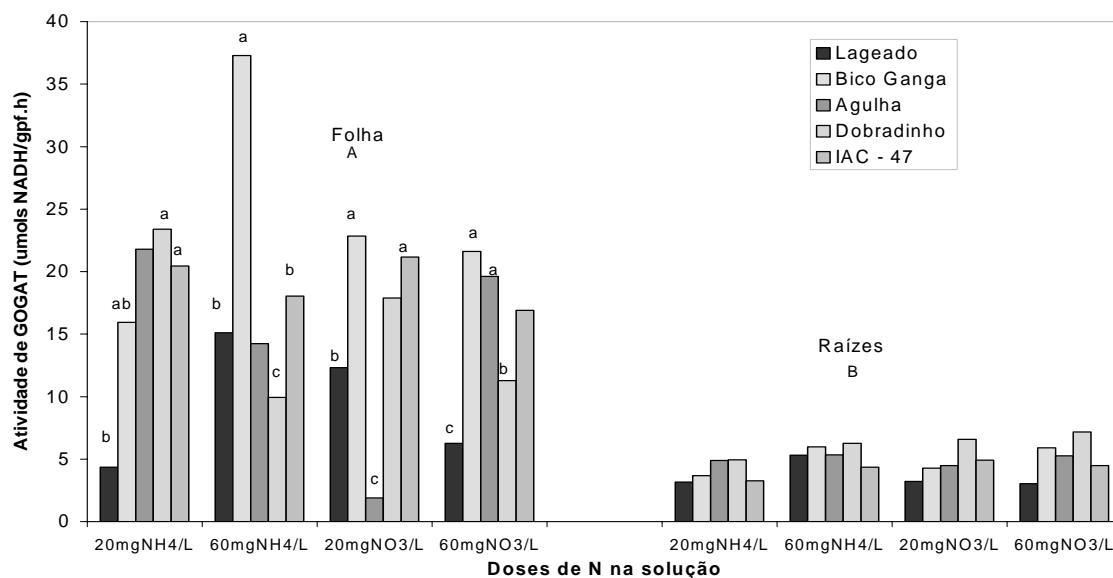


Figura 21. Atividade de GOGAT em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.

A aparente falta de resposta da atividade de NADH-GOGAT em raízes em função do aumento de N no meio, poderia ser explicado pela presença da isoforma Fd-GOGAT neste tecido ser predominante e portanto não detectada nesta análise.

Yamaya et al. (1995) estudando a resposta de GOGAT em raízes e folhas de arroz ao suplemento de N no meio de cultivo, verificaram que a Fd-GOGAT era a principal isoforma, em termos de atividade, em raízes de arroz cultivadas em solução desprovida de N. Quando as raízes eram expostas à solução com N, esta isoforma era trocada pela NADH-GOGAT durante as primeiras 72 horas de exposição a N. A deficiência de N na solução não provocava mudanças nas isoformas. Em folhas ambas formas de GOGAT tinham altas expressões. Os autores concluíram que os efeitos da deficiência de N eram manifestados principalmente em raízes.

É importante mencionar que durante a condução deste experimento as plantas de arroz permaneceram 42 horas em solução desprovida de N, com o objetivo de intensificar o influxo de N através da plasmalema em células radiculares. É possível que essa prática tenha ocasionado a inversão das isoformas de GOGAT nas células de raízes, refletindo neste experimento na baixa atividade de NADH-GOGAT nas raízes, que provavelmente deveria estar em fase de ascendência.

No futuro, experimentos devem ser conduzidos para elucidar se esse fenômeno estava de fato ocorrendo ou se realmente a atividade de NADH-GOGAT era baixa.

e) Atividade de GDH-Aminação

A atividade de GDH-A existiu exclusivamente em folhas, independente de concentrações e forma de N no meio (Figura 22). Resultados semelhantes foram obtidos por Delú-Filho et al. (1998) que verificaram que a atividade de GDH era significativamente maior nas folhas do que nas raízes de plantas jovens de seringueira.

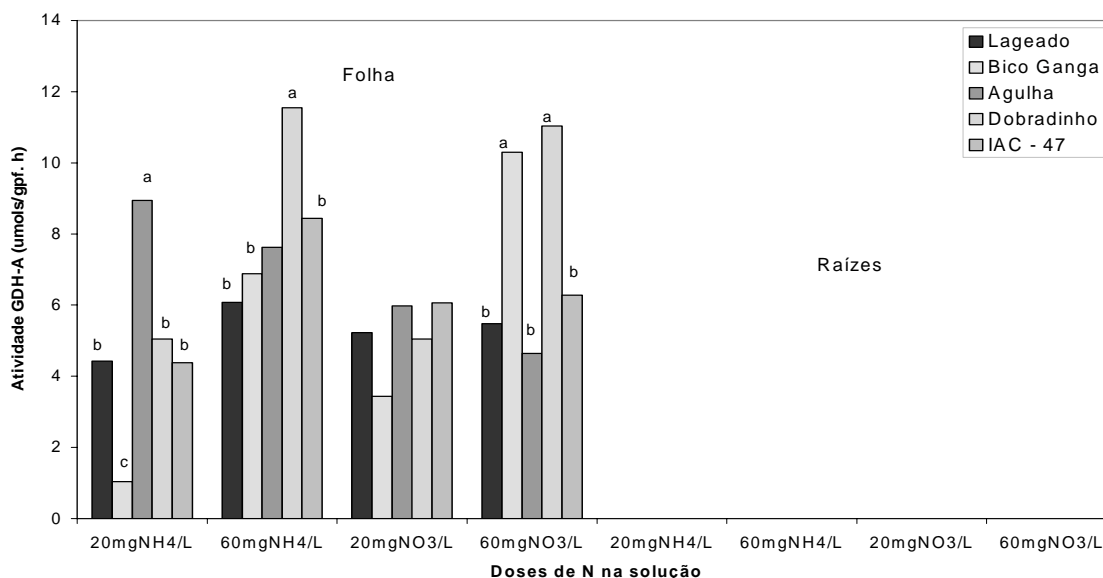


Figura 22. Atividade de GDH-Aminação em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.

f) Atividade de GDH-Deaminação

A atividade de GDH-D foi significativamente ($p = 0.05$) maior nas raízes do que nas folhas (Figuras 23). Atividade de GDH-D foi bastante distinta, não seguiu um padrão de respostas nem para os efeitos dos tratamentos (forma e dose N) e nem para as variedades.

Pode-se observar, na figura 23, que a atividade da GDH-D é nitidamente maior nas raízes da variedade Lageado, que receberam 60 mg de N, seja na forma de nitrato ou amônio.

A atividade de GDH-D apresentou correlação com os teores de NO_3^- quando a concentração de N foi de 60 mgN/L. No tratamento de 20 mgN, somente a variedade Lageado mostrou tal correlação. Em ambientes com altas concentrações de NO_3^- no meio de cultivo, a absorção de NO_3^- ocasiona a presença de elevados teores de NO_3^- nas raízes, esse processo é dependente da alta demanda de energia metabólica. Provavelmente, a presença de alta atividade de GDH-D nos tecidos radiculares foi devido a maior demanda α -cetoglutarado para o ciclo de Krebs (ciclo do ácido cítrico). A produção final de ATP por unidade de acetil é de 12 moléculas por ciclo (uma molécula é formada diretamente no ciclo e as demais quando 3 NADH e 1 FADH são oxidados pela cadeia de transporte de elétrons. Essa energia formada poderia estar sendo usada para redução de NO_3^- .

Não foram detectadas correlações entre a atividade de GDH-D e as atividades de GS e GOGAT.

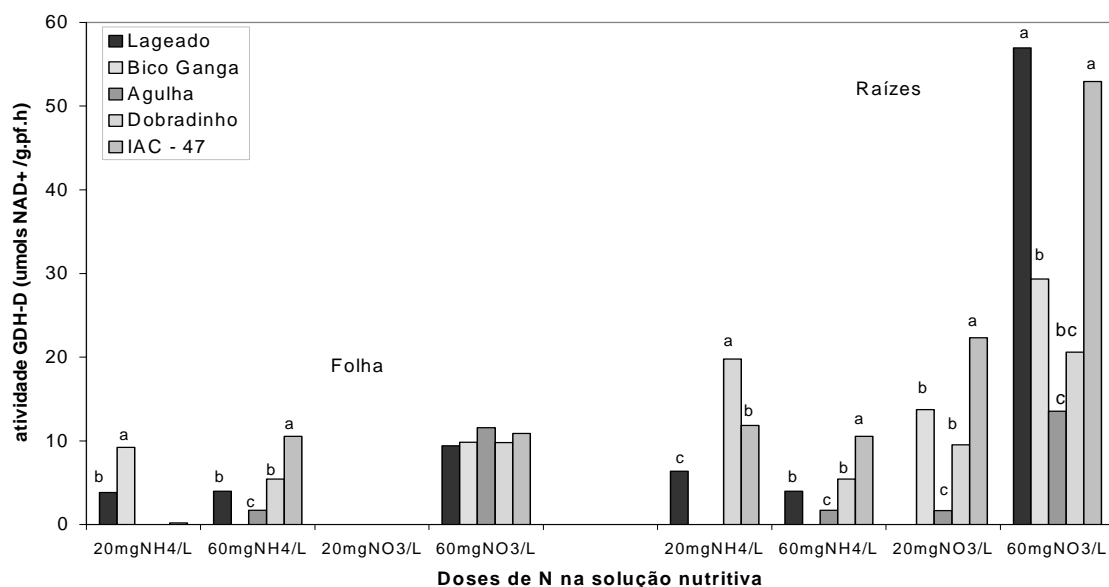


Figura 23. Atividade de GDH-Deaminação em folhas e raízes de plantas de arroz com 42 DAG em função das doses de N.

Tabela 7. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 60 mg N/L) (1º experimento: Cinética de absorção).

20mgN-NH4/L								
	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R	Vmáx	
NH ₄ ⁺ F	1,00	0,11	-0,07	0,19	0,21	-0,91		
NH ₄ ⁺ R	0,19	-0,70	-0,26	-0,87	-0,70	0,17		
Amino F	-0,07	-0,96	1,00	0,90	0,85	-0,26		
Amino R	0,19	-0,87	0,90	1,00	0,70	-0,40		
Açúcar F	0,21	-0,70	0,85	0,70	1,00	-0,59		
Açúcar R	-0,91	0,17	-0,26	-0,40	-0,59	1,00		
Vmáx	-0,18	-0,92	0,78	0,64	0,49	-0,05		
K _M	-0,26	-0,85	0,91	0,63	0,85	-0,15	0,80	
60 mgN-NH4/L								
	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R	Vmáx	
NH ₄ ⁺ F	1,00	0,27	-0,17	-0,33	0,28	0,53		
NH ₄ ⁺ R	-0,33	-0,21	-0,13	-0,56	-0,21	0,19		
Amino F	-0,17	-0,98	1,00	0,42	0,38	-0,13		
Amino R	-0,33	-0,56	0,42	1,00	-0,48	0,06		
Açúcar F	0,28	-0,21	0,38	-0,48	1,00	0,41		
Açúcar R	0,53	0,19	-0,13	0,06	0,41	1,00		
Vmáx	-0,05	-0,84	0,80	0,76	0,18	0,32		
K _M	-0,01	-0,05	-0,10	0,83	-0,71	0,24	0,62	
20mgN-NO3/L								
	NO3 F	NO3 R	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO3 F	1,00	-0,17	-0,17	-0,38	0,23	0,48	0,18	0,38
NO3 R	0,36	1,00	-0,93	0,53	-0,19	-0,28	-0,63	0,35
NH ₄ ⁺ F	-0,17	-0,93	1,00	-0,57	0,26	0,48	0,66	-0,45
NH ₄ ⁺ R	-0,38	-0,19	0,48	-0,97	0,67	-0,89	-0,97	0,42
Amino F	0,23	-0,19	0,26	0,26	1,00	-0,33	-0,35	0,67
Amino R	0,48	-0,28	0,48	-0,89	-0,33	1,00	0,87	-0,58
Açúcar F	0,18	-0,63	0,66	-0,97	-0,35	0,87	1,00	-0,60
Açúcar R	0,38	0,35	-0,45	0,42	0,67	-0,58	-0,60	1,00
Vmáx	-0,59	-0,53	0,35	0,38	0,59	-0,64	-0,31	0,32

K _M	-0,59	-0,88	0,96	-0,38	0,52	0,28	0,45	-0,21
60 mgN-NO3/L								
	NO3 F	NO3 R	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO3 F	1,00	-0,49	-0,49	0,33	0,93	0,58	0,42	-0,56
NO3 R	0,81	1,00	-0,87	-0,02	0,73	0,90	0,49	-0,16
NH ₄ ⁺ F	-0,49	-0,87	1,00	0,03	-0,35	-0,76	-0,16	-0,02
NH ₄ ⁺ R	0,33	0,73	-0,76	-0,34	-0,59	-0,40	-0,34	-0,93
Amino F	0,93	0,73	-0,35	0,29	1,00	0,60	0,67	-0,59
Amino R	0,58	0,90	-0,76	-0,40	0,60	1,00	0,72	0,19
Açúcar F	0,42	0,49	-0,16	-0,34	0,67	0,72	1,00	0,01
Açúcar R	-0,56	-0,16	-0,02	-0,93	-0,59	0,19	0,01	1,00
V _{máx}	0,33	-0,24	0,65	0,34	0,47	-0,30	0,27	-0,55
K _M	0,33	0,17	-0,31	-0,26	-0,27	0,05	-0,53	0,40

Tabela 8. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 60 mg N/L). (1º experimento: Cinética de absorção).

20mgN-NH4/L							
	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R	
NH ₄ ⁺ F	1,00	0,66	0,31	-0,20	-0,12	0,00	
NH ₄ ⁺ R	0,66	1,00	0,32	-0,07	0,04	0,63	
Amino F	0,31	0,32	1,00	0,86	0,85	-0,03	
Amino R	-0,20	-0,07	0,86	1,00	0,97	-0,15	
Açúcar F	-0,12	0,04	0,85	0,97	1,00	-0,20	
Açúcar R	0,00	0,63	-0,03	-0,15	-0,20	1,00	
GS F	0,99		0,36		-0,03		
GS R		0,12		-0,41		-0,57	
GOGAT F	0,95		0,48		0,15		
GOGAT R		-0,28		-0,03		-0,39	
GDH-a F	0,42		0,19		-0,16		
GDH-a R							
GDH-d F	-0,61		-0,51		-0,01		
GDH-d R		0,61		0,64		0,52	

60 mgN-NH4/L							
	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R	
NH4 F	1,00	0,44	-0,42	-0,61	0,62	0,05	
NH4 R	0,44	1,00	0,35	-0,66	-0,32	0,92	
Amino F	-0,42	0,35	1,00	0,31	-0,36	0,62	
Amino R	-0,61	-0,66	0,31	1,00	0,14	-0,41	
Açúcar F	0,62	-0,32	-0,36	0,14	1,00	-0,59	
Açúcar R	0,05	0,92	0,62	-0,41	-0,59	1,00	
GS F	0,07		-0,60		-0,48		
GS R		-0,60		-0,10		-0,85	
GOGAT F	0,07		-0,60		-0,48		
GOGAT R		-0,82		0,67		-0,63	
GDH-a F	-0,57		0,16		0,22		
GDH-a R							
GDH-d F	-0,81		0,70		-0,44		
GDH-d R		-0,20		0,78		0,18	

Tabela 9. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 60 mg N/L)

20mgN-NO3/L								
	NO3 F	NO3 R	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO3 F		-0,93	0,12	0,55	0,16	0,51	0,88	0,02
NO3 R	0,32		-0,79	0,87	-0,20	0,27	0,15	0,27
NH ₄ ⁺ F	-0,79	-0,79	1,00	-0,47	0,85	0,18	-0,36	-0,40
NH ₄ ⁺ R	0,55	0,87	-0,47	1,00	-0,50	0,43	-0,41	-0,21
Amino F	0,16	-0,20	0,85	-0,50	1,00	-0,12	-0,07	0,06
Amino R	0,51	0,27	0,18	0,43	-0,12	1,00	-0,18	-0,89
Açúcar F	0,88	0,15	-0,36	-0,41	-0,07	-0,18	1,00	0,42
Açúcar R	0,88	0,27	-0,40	-0,21	0,06	-0,89	0,42	1,00
NR F	0,14		0,69		0,41		-0,29	
NR R		-0,63		-0,22		0,72		-0,89
GS F	0,08		-0,72		-0,58		0,42	
GS R		-0,66		-0,75		0,02		-0,24
GOGAT F	0,34		-0,48		-0,77		0,30	
GOGAT R		0,32		-0,46		-0,81		0,52
GDH-a F	-0,30		0,32		0,42		-0,32	
GDH-a R			#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!	
GDH-d F	#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!	
GDH-d R		-0,47		-0,56		-0,20		0,07
60 mgN-NO3/L								
	NO3 F	NO3 R	NH4 F	NH4 R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO3 F		-0,88	-0,04	0,67	0,58	0,55	0,74	0,06
NO3 R	0,28		-0,78	0,88	-0,04	0,38	0,46	-0,27
NH ₄ ⁺ F	-0,68	-0,78	1,00	-0,26	0,68	0,78	-0,07	0,33
NH ₄ ⁺ R	0,67	0,88	-0,26	1,00	-0,62	-0,74	0,73	-0,92
Amino F	0,58	-0,04	0,68	-0,62	1,00	0,92	-0,03	0,67
Amino R	0,55	0,38	0,78	-0,74	0,92	1,00	-0,37	0,71
Açúcar F	0,74	0,46	-0,07	0,73	-0,03	-0,37	1,00	-0,51
Açúcar R	0,74	-0,27	0,33	-0,92	0,67	0,71	-0,51	1,00
NR F	-0,62		0,22		0,08		-0,63	
NR R		-0,24		-0,50		0,61		0,77
GS F	0,72		0,42		0,74		0,12	
GS R		-0,82		0,11		-0,23		-0,13
GOGAT F	0,72		0,42		0,74		0,12	
GOGAT R		-0,37		0,62		-0,68		-0,71
GDH-a F	0,47		-0,72		-0,46		0,57	
GDH-a R			#DIV/0!		#DIV/0!		#DIV/0!	
GDH-d F	0,37		0,48		0,90		-0,42	
GDH-d R		0,78		0,10		-0,20		-0,25

3.7 CONCLUSÕES

As variedades de arroz estudadas apresentaram capacidade diferencial de absorção de nitrogênio.

O manejo das plantas é fator determinante no estudo de extrusão de prótons, visto que o estresse físico aparentemente interferiu na atividade das H⁺-ATPases.

Apesar da maior capacidade de desenvolvimento do sistema radicular estar associada a maior eficiência de absorção de N, esse fato não foi observado neste trabalho.

As variedades Agulha e a IAC 47 apresentaram as melhores combinações de K_M e V_{máx} em condições de alta disponibilidade de N-nitrico no meio, provavelmente, devido ao fato de serem cultivares melhoradas visando alta disponibilidade de N no meio, através da aplicação de fertilizantes nitrogenados, corroborando com esta hipótese aquelas apresentaram 70% de similaridade genética (Capítulo 1).

A variedade Bico Ganga apresentaram as melhores combinações de K_M e V_{máx} em condições de baixa disponibilidade de N. Além disso, Em ambiente com alta disponibilidade de N na solução nutritiva, essa variedade acumula NO₃⁻ tanto nas raízes como nas folhas.

Os resultados obtidos neste experimento indicam que os parâmetros cinéticos de absorção poderiam ser explorados em programas de melhoramento de arroz visando obter variedades eficientes na absorção de N.

4. CAPITULO III

EFEITO DO FLUXO SAZONAL DE NITRATO SOB O METABOLISMO DE N EM PLANTAS DE ARROZ

4.1 RESUMO

Estudos de eficiência de absorção e utilização de N por plantas de arroz são muito importantes do ponto de vista da sustentabilidade da agricultura e da qualidade do meio ambiente. As variedades Sagrimão, Goiano, Zebu, Agulha, IAC 1278, IR 08, Comum Branco, IAC 25 e Ligeiro foram cultivadas em solução nutritiva, com o objetivo de estudar a assimilação e remobilização de N em condições sazonais de nitrato. Neste experimento, as atividades da nitrato redutase (NR), da glutamina sintetase (GS), da glutamato sintase (GOGAT) e da glutamato desidrogenase aminação e deaminação (GDH-A e GDH-D) foram avaliadas em folhas e raízes de arroz com 62 e 69 dias de idade, cultivadas em solução nutritiva contendo 20 e 200 mgN-NO₃⁻/L. O aumento no suprimento de nitrato aumentou a atividade da NR, da GS e GOGAT em plantas de arroz. A redução do nitrato parece ocorrer tanto no sistema radicular quanto na parte aérea. Todavia, observa-se que a atividade da NR foi maior nas raízes, assim que a dose de 200 mgN/L foi retirada do meio de cultivo. Na dose de 200 mg N/L, a atividade de NR nos tecidos foliares aumentou, nas variedades locais Sagrimão, Goiano, Zebu e Agulha, o que nesta fase do estágio de desenvolvimento, pode indicar que essas variedades apresentam um mecanismo genético-fisiológico para absorver o NO₃⁻ do meio externo e armazená-lo em compartimento de reserva, e posteriormente remobilizá-lo para os grãos. As atividades da GS foram baixas nas raízes, em comparação com as atividades observadas nas folhas, independente da variedade estudada. A atividade da GOGAT foi maior nas raízes, em ambos os tratamentos, para as variedades Sagrimão, Goiano e Zebu Branco. A atividade de GDH-A ocorreu principalmente em tecidos foliares, independente das variedades estudadas. A atividade de GDH-D ocorreu tanto em folhas como em raízes, sendo que em raízes somente ocorreu atividade de GDH-D nas variedades Sagrimão, Goiano, Zebu Branco, Agulha e IAC 1278, porém, na variedade Ligeiro, somente no tratamento de 200 mg N/L. Quanto a atividade de GDH-D em folhas, somente as variedades Sagrimão e Goiano não apresentaram atividade. A atividade das enzimas de assimilação de N foi superior nas folhas, indicando serem estas os principais sítios de incorporação de amônio em aminoácidos, quando as plantas de arroz são submetidas a altos níveis de NO₃⁻.

Palavras-chave: Eficiência, absorção de nitrato, partição de N.

4.2 ABSTRACT

Studies the efficiency of N⁻uptake and utilization by rice plants are very important from the point of view of sustainable agriculture and environmental quality. Varieties Sagrimão, Goiano, Zebu, Agulha, IAC 1278, IR08, Comum Branco, IAC 47 e Ligeiro had been cultivated in nutritional solution, with the objective to study the assimilation and remobilização of N in season nitrate conditions. In this experiment, the activities of the enzymes Nitrate Reductase (NR), Glutamine Synthetase (GS), Glutamate Synthase (GOGAT) and Glutamate Dehydrogenase amination and deamination (GDH-A and GDH-D) were studied in the leaf blades and root of 62 and 69 days old rice plants, under 20 and 200 mg mg N-NO₃⁻/L, in nutrient solution. The reduction of nitrate seems in such a way to occur in rice tissues foliar e roots. Under higher nitrate supply had increase the activity of the NR, GS and GOGAT in rice plants. However, was observed that the NR activity was bigger in the roots, thus of 200 mgN/L was removed in nutriente solution. In the 200 mg N/L, the NR activity in tessies foliar increased, in the varieties Sagrimão, Goiano, Zebu and Agulha, what in this phase of the development, can indicate that these varieties present a genetic-physiological mechanism to NO₃⁻-uptake and to store it in reserve compartment, and later to remobilizar it for the grains. The GS activities had been low in roots, in comparison with the activities observed in leaf, independent of the studied variety. The GOGAT activity was bigger in roots, in both the treatments, for the varieties Sagrimão, Goiano and Zebu Branco. The GDH-A activity occurred mainly in tessues foliar, independent of the varieties. The GDH-D activity occurred in leaf as in roots, being that in roots, only GDH-D activity of occurred in varieties Sagrimão, Goiano, White Zebu, Agulha and IAC 1278, but in the variety Ligeiro, only in 200 mg N/L. The GDH-D activity not occurred in tissues foliar of the varieties Sagrimão and Goiano. The activity of the enzymes of N-assimilation was higher in tissues foliar. These results seem indicate the leaves as the main site of NH₄⁺-N assimilation in rice plants under higher NO₃⁻-supply.

Keywords: Efficiency, nitrate uptake, N-partition.

4.3 INTRODUÇÃO

O sistema de cultivo de arroz predominante no Brasil é o de sequeiro. Aproximadamente 60% da produção de arroz é proveniente deste sistema, ocupando 76% da área cultivada com arroz. O arroz de sequeiro caracteriza-se pelo seu cultivo em “terras firmes” e com baixa fertilidade (GUIMARÃES, 2000).

A baixa produtividade do arroz de sequeiro no Brasil é consequência basicamente da má distribuição pluviométrica, nas regiões produtoras, e a baixa aplicação de adubos e corretivos. Os nutrientes mais deficientes são em ordem decrescente de importância: nitrogênio, fósforo, zinco, potássio, cálcio e magnésio. O grau de relevância da adubação nitrogenada na rizicultura justifica a necessidade de estudos básicos visando a caracterização de genótipos eficientes na absorção e uso de N. Estes estudos são fundamentais para superar ou minimizar a baixa disponibilidade de N nos solos. Genótipos eficientes na absorção poderiam aproveitar melhor os períodos nos quais o N poderia estar disponível em níveis em mais elevados.

Nos trópicos úmidos tem-se observado que nos solos destas regiões ocorre um acúmulo de NO_3^- nas camadas superficiais do perfil de solo nos meses de seca (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995). Campbell (1999) relata que em plantas adaptadas a estas condições ocorre um incremento da atividade da enzima nitrato redutase em decorrência da elevação da concentração de NO_3^- no solo.

Existe um grupo de variedades de arroz que aparentemente sofreram um processo intenso de adaptação às condições tropicais, sendo consideradas "variedades locais" do Maranhão. O conhecimento dos mecanismos de absorção, assimilação e transporte do nitrato nessas variedades é importante na avaliação do comportamento fisiológico das mesmas, em diferentes estádios de desenvolvimento das plantas, nas diferentes condições climáticas e edáficas das regiões com potencial para o desenvolvimento da rizicultura.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar em função da variabilidade genética existente entre as variedades de arroz a eficiência de assimilação de N, simulando em solução nutritiva o fornecimento sazonal de nitrato.

4.4 REVISÃO DE LITERATURA

4.4.1 Absorção de NO_3^- pelas Plantas

As plantas adquirem o nitrogênio principalmente através da absorção do nitrato pelas raízes, exceto aquelas que apresentam associações simbióticas com bactérias capacitadas a redução de N_2 do ar (FBN).

A aquisição de nitrogênio do solo sob a forma de NO_3^- começa no apoplasto, conhecido como "espaço livre aparente" e termina no citoplasma de células radiculares ou do mesófilo foliar, local da redução do NO_3^- , processo dependente de energia, que culmina com a formação de NH_4^+ (Pate, 1980).

O NO_3^- é absorvido ativamente pelo córtex de raiz, e então, carregado para o xilema após atravessar várias células e plasmodesmas. O processo de transpiração transporta NO_3^- para a folha onde novamente será ativamente carregado, para o interior das células do mesófilo. Na célula, NO_3^- é reduzido a NH_4^+ e subsequentemente assimilado em N orgânico. O processo acontece em três passos de acordo com o esquema abaixo: (MARSCHNER, 1995; OAKS & HIREL, 1985) (Figura 1):

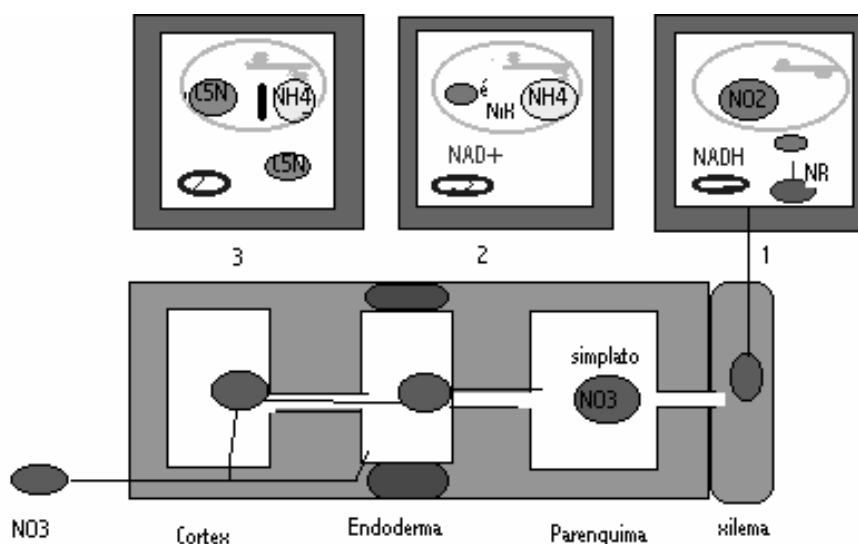


Figura 1. Esquema dos processos de redução e assimilação de nitrato: no citoplasma, NO_3^- é reduzida a NO_2^- pela nitrato redutase (NR – EC.1661); a reação usa o agente redutor NADH (mitocôndria); NO_2^- migra para o cloroplasto (folha) ou para os plastídeos (raiz) onde a redução a NH_4^+ é mediada pela nitrito redutase (NiR). Os seis (6) elétrons são doados para esta reação pela ferredoxina, um dos componentes da cadeia de transportadores de elétrons do fotossistema I; No cloroplasto, NH_4^+ é incorporado em um composto orgânico com 5-C, formando glutamato. O Glutamato pode sofrer uma amidação (adição de outra molécula de NH_4^+) formando glutamina..

Em tecidos não-fotossintetizantes, os elétrons doados para a ação catalítica de NiR derivam da via oxidativa da pentose-fosfato. A ferredoxina (Fd) oxidada pode ser reduzida pela ação de Fd-NADPH oxidoreductase, sendo o NADPH o doador de elétrons (GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001).

Segundo Grossman & Takahashi (2001), o nitrato induz a expressão dos genes de ferredoxina, de Fd-NADPH oxidoreductase e de 6-fosfogluconato, esses último é um

componente da via oxidativa da pentose-fosfato. Além disso, NO_3^- é uma das moléculas reguladoras da atividade transcricional dos genes codificadores dos transportadores de NO_3^- e NO_2^- , os genes da NR e NiR. Os processos postranscricionais também são influenciados por essa molécula.

Aparentemente, a concentração de NO_3^- no solo é um dos fatores que controlam o sítio da assimilação de NH_4^+ . Quando o nutriente está escasso no solo, a assimilação é preferencialmente nas raízes; quando está abundante, nas folhas. Quando o N- NO_3^- é adicionado ao meio de cultivo, a atividade da RN (OAKS, 1992; ASLAM & OAKS, 1976) e a quantidade da proteína-NR (GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001) são aumentadas em diferentes tecidos de folhas e raízes, entretanto Srivastava (1980) afirmou que o efeito da concentração de NO_3^- na atividade da RN depende da espécie e do genótipo. Essa é corroborada pelos dados obtidos por Traore & Maranville (1999), em sorgo verificaram que a concentração de NO_3^- não influenciou a atividade de NR.

A nitrato redutase (NR) é considerada a enzima chave na regulação do metabolismo do N, visto que a etapa da redução é obrigatória, pois quando nitrato é absorvido pelas raízes deve ser necessariamente reduzido a amônio para poder ser incorporado em compostos orgânicos. Friedrich e Schrader (1978) verificaram que a atividade da NR mostrou-se muito sensível a variação de enxofre nas plantas, sendo reduzida em condições de deficiência desse nutriente. Os autores levantam a hipótese da nitrato redutase servi como acoplador primário e regulador não só da assimilação de NO_3^- mas também do SO_4^- .

A hipótese que de a capacidade em responder à adubação nitrogenada está relacionada à atividade da NR deve-se ao seu papel regulador da disponibilidade de N reduzido no metabolismo de plantas, principalmente em cultivos no qual nitrato é a principal forma de N disponível (PURCINO et al., 1994).

Vários trabalhos experimentais, utilizando genótipos de várias espécies, foram conduzidos para testar essa hipótese e avaliar a possibilidade de se utilizar a atividade dessa enzima como ferramenta auxiliar no desenvolvimento de materiais mais produtivos, mais responsáveis à adubação nitrogenada ou mais eficientes no uso desse nutriente (MACHADO et al., 2001; TRAORE & MARANVILLE, 1999).

Em cereais, a literatura reporta que apesar de controvérsias, existe correlação entre produtividade de grão e atividade de NR em folhas (MACHADO, et al., 1992,). Purcino et al. (1994) desenvolveu um experimento com o objetivo de verificar a possível existência de correlação entre os dados de atividade da nitrato redutase e a produtividade de espigas secas de milho. Eles observaram que não houve associação entre produção de espigas secas e atividade de NR em folhas de milho, durante o período de 3 a 45 dias após o embonecamento, quando as plantas foram cultivadas sob dois níveis de adubação nitrogenada. Apesar dos genótipos terem respondido à adubação nitrogenada tendo produtividade significativamente diferente entre si. Os autores concluíram que como a quantidade ou a atividade de NR não limitou a produtividade das plantas mesmo no nível mais baixo de N, a alocação suplementar de N deve ter sido dirigida para síntese *de novo* das enzimas que estavam realmente limitando a produção.

Em sorgo, resultados similares foram observados por Traore e Maranville (1999) que verificaram correlação entre atividade de NR e produção de grão. Além disso, observaram que a atividade de NR não apresentava correlação com a partição de N na planta e nem era o único fator limitante da redução do acúmulo de N na planta.

Existem outros sistemas enzimáticos como as peroxidases e fotoquímicos capazes de reduzir nitrato a amônia em células, porém possuem baixa eficiência quando comparado ao sistema de redução via NR-Nir (NAIK et al., 1976).

4.4.2 Sistemas de Transporte de NO_3^- em Plantas

A absorção de nitrato pelo sistema radicular é um processo fisiológico crítico para o desenvolvimento de plantas superiores, pois é a primeira etapa da via de assimilação que fornece a maior parte do nitrogênio orgânico requerido para a síntese das biomacromoléculas: proteínas e ácidos nucleicos. Investigações fisiológicas indicaram que as plantas evoluíram sistemas de transportes para absorver nitrato em níveis de concentrações externas que podem variar até 10.000 vezes de um ambiente.

Para alguns pesquisadores a concentração a partir da qual o LATS começaria a entrar em ação seria superior a 0,2 mM (VIDMAR et al, 2000 e 2000a).

A velocidade máxima (V_{max}) registrada para o iHATS é geralmente superior à HATSc, sugerindo que aquele sistema tem um papel chave na absorção de NO_3^- do meio externo, sendo que esta concentração de NO_3^- não excede 0,5 mM. A atividade do LATS tornar-se significativa, se não predominante, quando a concentração de NO_3^- aumenta acima de 1 mM. Todos os três sistemas de transporte podem coexistir em uma única célula e acredita-se que suas atividades são aditivas (Liu et al., 1999).

O estudo da cinética de absorção desses transportadores em diferentes espécies foi feito pelas técnicas de depleção do íon na solução ou pela medição da absorção de $^{13}\text{N}\text{NO}_3^-$, objetivando determinar a concentração de nitrato limite em que os sistemas operavam, e foi verificado que o limite entre o transporte de baixa e alta-afinidade é em torno de 0,5 mM (LARSSON & INGEMARSSON, 1989).

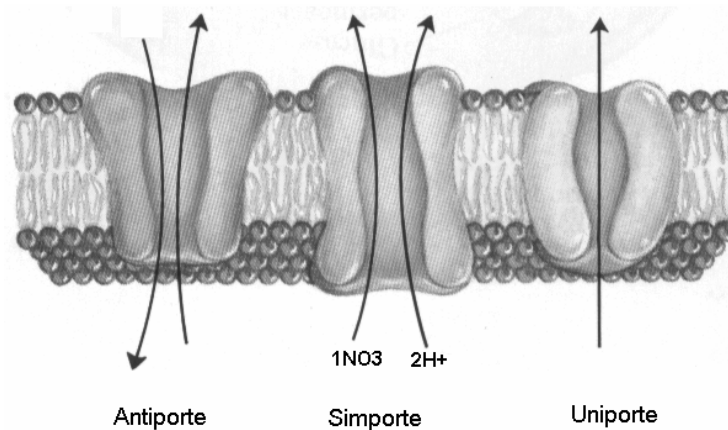
Esforço considerável tem sido feito na tentativa de isolar os transportadores responsáveis por cada um dos três sistemas constatados nesses estudos. Embora os estudos em biologia molecular utilizando a técnica de clonagem complementar - cDNA - tenha caracterizado vários transportadores iônicos em plantas, a caracterização molecular dos genes responsáveis pela codificação dos transportadores de nitrato ainda não foi possível (WILLIAM & MILLER, 2001).

4.4.3 Transportadores de NO_3^-

A estrutura dos sistemas de transporte responsáveis pela absorção de NO_3^- pelo sistema radicular parece ser de ocorrência geral porque todos os três sistemas foram relatados em uma grande escala de espécies de plantas (WILLIAMS & MILLER, 2001). A identidade molecular das proteínas que participam da atividade dos três sistemas de transporte é ainda pouco compreendida, porém ao menos duas famílias de genes são conhecidas por codificar os transportadores de NO_3^- .

Williams & Miller (2001) relata que essas duas famílias de proteínas devem provavelmente mediar o transporte de NO_3^- através das membranas, presumivelmente através de simporte com prótons na proporção de $2\text{H}^+/\text{NO}_3^-$ (Figura 2).

Ambas as famílias possuem membros em procariotos e eucariotos. A **Família de Transportador Peptídeo (PTR)** incluem membros que transportam uma ampla gama de substratos nitrogenados, incluindo aminoácidos, peptídeos e nitrato. A análise filogenética indica que existem quatro grupos de transportadores distintos nessa família: Grupo I, presente em bactérias; Grupo II, presentes em animais; Grupo III, presentes em fungos e bactérias; e Grupo IV, exclusivo de plantas (WILLIAMS & MILLER, 2001). Todos os membros dessa família possuem as seguintes características: i^o Os domínios 2, 3 e 50 da estrutura protéica são regiões conservadas, ii^o possuem a proteína quinase C no início do laço citoplasmático.



Fonte: Lehninger et al, 2000.

Figura 2. As três classes gerais de sistemas de transporte.

A Família de Transportador Peptídeo parece compor o sistema de transporte de baixa-afinidade (LATS). Estudos de clonagem e caracterização funcional dos genes responsáveis pelos sistemas de transporte, identificaram o primeiro gene de transportador de NO_3^- em plantas superiores, isolado de *Arabidopsis*. Identificado originalmente CHL1 (AtNRT1) considerado do sistema LATS, parecia ser responsável por um sistema induzido de baixa afinidade \bar{i} LATS. Entretanto, esse gene AtNRT1 também era de natureza constitutiva, com grande capacidade de ação na faixa de absorção do LATS, e apresentava uma cinética de absorção bifásica, em ambos os sistemas de transportes, sugerindo que esse transportador possuía dupla afinidade (FILLEUR et al., 1999).

Essa constatação esclareceu o modelo bifásico de absorção do nitrato pelo sistema de baixa-afinidade observado em *Arabidopsis* (HUANG et al., 1996). Provavelmente, a existência de \bar{i} LATS em plantas superiores acontece de forma generalizada. Zhou et al. (1999) em estudo de caracterização funcional dos transportadores de nitrato em *Brassica napus* encontraram um homólogo do gene CHL1, o BnNRT1 que é induzido pelo nitrato e apresenta atividade de absorção de nitrato em sistema de baixa afinidade. Em adição, dois genes homólogos de CHL1 foram identificados em tomate, LeNRT1¹ e LeNRT1², que são constitutivamente expresso e também são induzido pelo nitrato (GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001).

Liu et al. (1999) demonstraram que CHL1 está envolvido diretamente na absorção de nitrato nos sistemas de transporte de alta afinidade. Os ensaios feitos em vivo em planta de *Arabidopsis* forneceram evidências moleculares que indicavam a presença de uma única proteína transportadora de nitrato com ação em mais de um sistema de absorção.

A expressão dos genes, que codificam os transportadores da Família de Transportadores de Peptídeo, parece estar correlacionada com mudanças no pH do meio externo. Liu et al. (1999) constataram que houve um abundante aumento de mRNA de AtNRT1 quando o pH do meio aumentou na ausência de nitrato.

Kun-Hsiang et al. (1999) estudaram as duas fases da absorção de nitrato, a fase constitutiva e a induzida, em plantas geneticamente modificadas (chl1^{-1}) e as tipo selvagens de *Arabidopsis* com o objetivo de avaliar o efeito do pH sobre a absorção de nitrato. As plântulas crescidas em meio que continha 12,5 mM de succinato de amônio ou $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ por 12 dias, foram transferidas para um meio com 250 mM KNO_3 a pH 5,5 e ou pH 7,0. Observou-se que o pH citoplasmático do mutante chl1^{-1} era mais ácido que os do tipo selvagem, quando as plantas eram crescidas em meio livre de

nitrito (só com amônia) e mais alcalino quando crescido em meio com NH_4NO_3 . Os estudos evidenciaram que os sistemas de absorção de nitrito em *Arabidopsis* utilizavam um mecanismo de transporte acoplado a próton.

A outra Família é a dos Carreadores Nitrito-Nitrito (NNP) e o primeiro membro identificado foi em *Escherichia coli* e mostrou mediar o efluxo de NO_2^- (WILLIAM & MILLER, 2001).

Em plantas superiores têm-se identificados diversos genes de um segundo transportador denominado NRT2 pertencentes a Família de *Carreadores Nitrito-Nitrito* que expressam-se principalmente nas membranas dos tecidos radiculares. Vidmar et al. (2000) observaram que em cevada a expressão era principalmente em córtex e epiderme de raízes. Em tomate, a expressão era generalizada em todos os tecidos radiculares, e que era induzida pela presença de nitrito no meio.

Os genes da família NRT2 são homólogo ao gene *crnA* do transportador de nitrito do sistema de alta-afinidade do fungo *Aspergillus* (UNKLES et al., 1991), aos genes NAR3/NAR4 de *Chlamydomonas* e àqueles que codificam os HATS para NO_3^- e/ou NO_2^- *Neurospora cras* (QUESADA et al., 1997). Incluem ainda os homólogos BCH1 e BCH2 da cevada (TRUEMAN et al., 1996), NpNRT2-1 do tabaco (QUESADA et al., 1997; Krapp et al., 1998), e AtNRT2;1 e AtNRT2;2 de *Arabidopsis* (DANIEL VEDELE et al., 1998; Filleur e Daniel Vedele, 1999). Todos estes genes NRT2 são expressos nas raízes, e suas expressões são nitrito-induzidas. Sua regulação é controlada pelo “nível” de nitrogênio da planta, possivelmente pelo NH_4^+ reduzido e pelo aminoácidos sintetizados (FILLEUR et al., 2001).

Em resposta a presença de nitrito no meio, verifica-se rapidamente um incremento no nível de mRNA de HvNRT2 (BCH), uma proteína composta de 504 a 509 aminoácidos, com peso molecular em torno de 55kD, que apresenta uma região hidrofóbica que transpassa a membrana.

Além disso, observa-se que o nível do transcrito AtNRT2.1 aumenta muito pela transição da fase escura à luz e pelo teor de açúcar nas raízes, sugerindo que a absorção de NO_3^- está sob diretamente sob o controle da atividade fotossintética (FILLEUR et al., 2001).

Os genes NRT2 fazem parte de uma família multigênica, em cevada observou-se a presença de 7 a 10 membros (VIDMAR et al., 2000). Dados disponíveis na literatura sugerem que as proteínas NRT2 são componentes principais dos HATS em plantas superiores (Forde, 2000; Filleur et al., 2001). Entretanto, ainda não se conhece o sistema específico de transporte (HATSc ou iHATS) codificado por genes de NRT2. Porém, vários estudos mostram que a regulação da absorção do NO_3^- pelas raízes é modificada pela alteração da expressão desses genes (FRAISIER et al., 2000).

4.4.4 Regulação da Absorção de Nitrito

O nitrito é a forma mais comum de N inorgânico utilizado por plantas (MARSCHNER, 1995). Como resposta metabólica à absorção de nitrito como nutriente, há uma reprogramação do metabolismo de nitrogênio e de carbono, sendo nitrito o sinal. Estas respostas envolvem mudanças rápidas na expressão de genes, entretanto, os mecanismos envolvidos nessa regulação ainda não são bem compreendidos (CEREZO et al., 2000).

Como mencionado anteriormente, a redução do nitrito ocorre no citosol das células de folhas e raízes e usa NAD(P)H como a fonte redutora. A redução do nitrito ocorre nos cloroplastos e nos plastídeos das raízes e usa a ferredoxina reduzida (Fd) como agente redutor. Nos tecidos verdes, os agentes redutores originam do transporte de elétron da fotossíntese; em tecidos não clorofilados, os agentes redutores originam-se da via oxidativa da pentose-fosfato. Além dos carboidratos necessários para a

incorporação do amônio em aminoácidos, é necessária também manutenção do pH celular porque a redução do nitrato gera íons hidroxilas.

Portanto, a reprogramação dos processos metabólicos estimulados pelo NO_3^- inclui a absorção e a redução do nitrato, a assimilação do amônio, a síntese de ácidos orgânicos, a redução do Fd, e a oxidação da glicose. O nitrato suprime também a síntese de macromoléculas como estratégia de mobilização do carbono em ácidos orgânicos. Estas respostas ao nitrato envolvem o controle direto da expressão de genes envolvidos na assimilação do nitrato e do amônio, de forma rápida em torno de 0,5 a 1 hora, verificados em concentrações de mRNA dos genes, mesmo na presença de inibidores da síntese da proteína (WILLIAM & MILLER, 2001).

O gene o mais estudado é o da NR, por ser induzido pelo substrato. NR mRNA acumula nas plantas dentro de minutos após o tratamento com o nitrato (CHENG et al., 1986). Resultados semelhantes foram obtidos por Cerezo et al. (2001). Os autores observaram que a atividade de NR, em raízes de *Citrus*, aumentava em função do aumento da concentração de NO_3^- .

Similarmente, os genes envolvidos na absorção do NO_3^- e na redução do NO_3^- e NO_2^- são induzidos rapidamente em presença de concentrações crescentes de nitrato. Similarmente, os genes envolvidos na absorção do nitrato ou na redução do nitrito são induzidos rapidamente sob concentrações crescentes de nitrato. Genes que codificam transportadores de NO_3^- (NRT1 e NRT2), NiR, Fd, NADP ,6-fosfogluconatase (6PGDH), metiltransferase III (UPM1), GS e de GOGAT, são também induzidos pelo NO_3^- (CEREZO et al. 2000).

Mutantes deficientes em NR de *N. plumbaginifolia* e *Arabidopsis* foram usados para estudar o efeito do NO_3^- sobre o sistema de transporte de NO_3^- de alta-afinidade e como resultado os autores encontraram elevados níveis de transcritos NRT2.1 em plantas do tipo selvagem (Krapp et al., 1998; Filleur e Daniel Vedele, 1999; Lejay et al., 1999), que é consistente com a hipótese que a abundância de transcritos NRT2.1 sofre retroregulação pelas formas de N reduzidas mais do que pelo próprio NO_3^- .

Os estudos de Doddema & Telkamp (1979), usando tungstênio com inibidor de NR, baseados em estudos dos parâmetros cinéticos de absorção de NO_3^- em *Arabidopsis*, evidenciaram o papel do NO_3^- no tecido na regulação do influxo de NO_3^- pelas raízes. Os autores concluíram que a regulação do influxo NO_3^- era mais bem controlada pelos metabólitos de $\text{N}:\text{NH}_4^+$ e/ou aminoácidos.

Os aminoácidos têm alta influência nos processos de absorção e redução de NO_3^- . A assimilação de NH_4^+ pode ocorrer tanto nas folhas ou nas raízes. As plantas que apresentam baixas taxas de assimilação de NH_4^+ nas raízes, exportam a maioria do NO_3^- absorvido para as folhas. Os aminoácidos das folhas são translocados às raízes através do floema. Os compartimentos de aminoácidos da raiz e da folha são considerados como um sinal para o “nível” de N da planta. Os, geralmente, tende a diminuir a indução dos sistemas de absorção e de redução de NO_3^- (WILLIAM & MILLER, 2001).

A regulação da indução dos sistemas de absorção e da redução de NO_3^- por compostos orgânicos originários de sua própria redução é denominada regulação por retroalimentação. Embora a indução desses sistemas seja dependente da disponibilidade do NO_3^- no tecido, os metabólitos derivados dos processos de redução e assimilação de N originários da absorção de NO_3^- podem exercer um controle sobre a própria absorção de NO_3^- .

Sivasankar et al. (1997) observaram que Gln e a asparagina (Asn) inibiam a indução da atividade de NR (NRA) em raízes do milho, independente se a concentração de NO_3^- externa era baixa ou elevada. Os autores concluíram que a indução/inibição da absorção de NO_3^- não era controlada somente pela concentração de NO_3^- no meio externo, mas, principalmente ao efeito direto dos metabólitos de N ao nível da transcrição de nitrato redutase (NR).

Aslam et al. (2001) observaram que Gln inibiu parcialmente a indução da atividade de NR em raízes de cevada, mas somente quando as concentrações de NO_3^- eram baixas. Provavelmente, porque em baixas concentrações de NO_3^- , a absorção é mediada pelo sistema de transporte de alta-afinidade induzido pela presença do substrato (iHATS). A absorção de NO_3^- pelo iHATS pode ser regulada pelos metabólitos de N, porém quando é mediada pelo LATS como este é um sistema constitutivo, não pode ser afetado pelo controle do compartimento de aminoácidos (CEREZO et al, 2000).

Scheible et al., (1997a) estudando o efeito da absorção de NO_3^- sob o metabolismo dos ácidos orgânicos usando plantas mutantes em NR, observaram após 2 horas do tratamento com o nitrato a 12 mM, que transcritos das enzimas piruvato kinase, citrato e isocitrato sintase citosólica tinham quantidades maiores que em plantas não mutantes crescidas em nitrato de 12 mM, sugerindo que esses genes respondem também ao sinal do nitrato.

Além desses efeitos metabólicos, o nitrato tem outros efeitos importantes na fisiologia vegetal. O nitrato aumenta a relação nitrogênio/carbono, diminui a relação raiz/parte aérea, atrasa a floração (MARSCHNER, 1995). A descontinuidade de fornecimento de nitrato no solo afeta a arquitetura da raiz, produzindo a proliferação de raízes laterais (FORDE, 2000).

A absorção NO_3^- pode sofrer os efeitos da absorção conjunta de NH_4^+ , e estes são complexos, devido à possibilidade de afetar a absorção NO_3^- em inúmeros níveis, tais como expressão dos transcritos, nível de proteína, ou efeitos diretos de NH_4^+ no transporte de NO_3^- . Por causa dessa complexidade há uma falta de consenso a respeito dos efeitos NH_4^+ sob os fluxos de NO_3^- . Usando NO_2^- como traçador de NO_3^- , Aslam et al. (1997) sugeriram que NH_4^+ aumentou o efluxo NO_3^- . Recentemente, Kronzucker et al. (1999) estudando o efeito de amônio sob a absorção de NO_3^- em raízes de cevada, observaram que a provisão de NH_4^+ aumentou o influxo de NO_3^- . Além disso, esse efeito ocorreu dentro do período de fornecimento de NH_4^+ , sugerindo que o próprio NH_4^+ estava agindo diretamente em cima do iHATS. Este efeito direto de NH_4^+ sobre o influxo de NO_3^- não descarta os efeitos indiretos, resultantes da assimilação de N. King et al. (1993) observaram o efeito da absorção de NH_4^+ era menor sob a absorção de NO_3^- do que os observados para os produtos de assimilação de NH_4^+ que inibiram a absorção nítrica, entretanto os autores não observaram efeito NH_4^+ sob a inibição do influxo NO_3^- .

4.5 MATERIAL E MÉTODOS

4.5.1 Localização e Condicionantes Ambientais.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 47, Seropédica, Itaguaí.

Durante o período experimental foram monitoradas as temperaturas máximas e mínimas diárias no interior da casa de vegetação (Anexo III) e a radiação na faixa dos comprimentos de onda fotossinteticamente ativos (400-700nm). A radiação foi medida no terço superior das plantas na casa de vegetação, com o objetivo de quantificar a porcentagem de radiação que estava passando para o interior da mesma; utilizou-se um radiômetro LI-COR modelo LI-185. Foram feitas duas leituras diárias às 9:00 e 15:00 horas, e obteve-se a radiação pela média aritmética entre as leituras.

4.5.2 Obtenção do Material Vegetal.

Utilizou-se o delineamento experimental de blocos casualizados, com três repetições, sendo os tratamentos constituídos pelas combinações de nove variedades de arroz (Tabela 1), duas concentrações de N - 20 e 200 mg N-NO₃⁻/L (correspondendo a 0,4 e 4,2 mM N-NO₃⁻). A concentração de 20 mg de N-NO₃⁻/L foi usada como testemunha. Para simular o fornecimento sazonal de N, as plantas foram submetidas, durante 7 dias, a uma solução nutritiva com 200 mg N-NO₃⁻/L, sendo nitrato de cálcio a fonte de N. Após esse período, o N foi retirado da solução.

Sementes das variedades Sagrimão, Goiano, Zebu, Agulha, IAC 1278, IR 08, Comum Branco, IAC 25 e Ligeiro foram germinadas sobre gases contidas em vasos com água.

Cinco dias após a germinação, as plântulas foram selecionadas de acordo com a uniformidade das raízes e da parte aérea e transferidas para vasos de 6 litros contendo solução nutritiva a ¼ da força iônica, pH 5,5 (± 0,1,) (HOAGLAND & ARNON, 1950). Após cinco dias, as plântulas foram transplantadas para uma solução de crescimento 1/2 força iônica, e, decorridos mais cinco dias, as plantas foram novamente selecionadas e transferidas para solução de crescimento a 1 força iônica, utilizando-se quatro plantas por vaso esse procedimento foi feito para não causar choque salino, pois radículas de arroz são bastante sensíveis à concentração salina no meio de crescimento, visto que estas absorvem avidamente os nutrientes em solução (FURLANI & FURLANI, 1988). Diariamente, o pH da solução nutritiva era corrigido e o volume mantido constante.

Com o objetivo de estudar a assimilação e remobilização de N em condições sazonais de nitrato, as plantas foram transferidas, aos 53 DAG, para vasos plásticos com 6 litros contendo solução nutritiva com 200 mg N-NO₃⁻/L, pH 5,5 ± 0.1 na forma nitrato de cálcio e os demais nutrientes utilizados para o crescimento das plantas estavam a uma força iônica, para simular o fornecimento sazonal de N. As plantas permaneceram sob estas condições por 7 dias. Após esse período o N foi retirado da solução (Esquema A). Como controle, houve um tratamento, para o qual, as plantas foram transferidas, aos 53 DAG, para solução nutritiva 20 mg N-NO₃⁻/L, pH 5,5 ± 0.1 na forma nitrato de cálcio e os demais nutrientes utilizados para o crescimento das plantas estavam a uma força iônica (Esquema B). As coletas foram feitas no segundo e nono dias após a interrupção do fornecimento de N, quando as plantas tinham de 62 e 69 dias após a germinação (Figura 3).

Contínuo de 20 mg N-NO₃ durante todo o período experimental. Esquema 1. Experimento sobre a Simulação do fornecimento sazonal de nitrato em plantas sob

cultivo em solução nutritiva. (A) com aplicação de 200 mg N-NO₃⁻ de maneira a criar a sazonalidade existente em determinados ambiente dos trópicos úmidos e (B) com fornecimento.

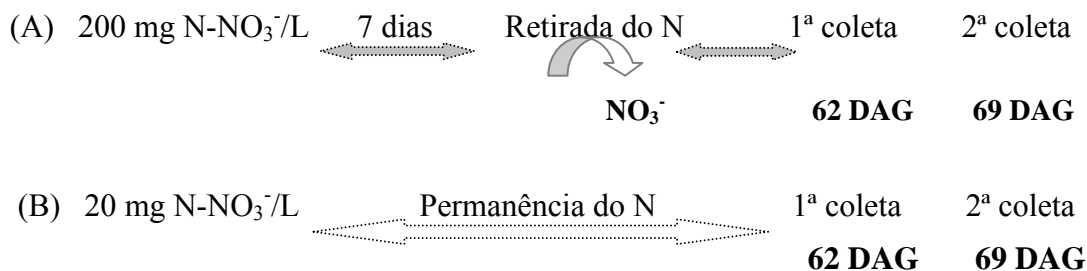


Figura 3. Esquema experimental da Simulação do fornecimento sazonal de nitrato em plantas sob cultivo em solução nutritiva. (A) com aplicação de 200 mg N-NO₃⁻ de maneira a criar a sazonalidade existente em determinados ambiente dos trópicos úmidos e (B) com fornecimento contínuo de 20 mg N-NO₃ durante todo o período experimental.

4.5.3 Enzimas do Metabolismo de N

a) Extratos vegetais

Os extratos vegetais foram obtidos pela maceração de 1 g de folhas e de 1 g de raízes em N₂ líquido e mantidos em 4 ml de solução tampão compostas por imidazol – HCL 0,5 pH 5,0 para determinação de GS e GOGAT. Em seguida, os extratos foram submetidos a uma filtração em gaze e papel de filtro, e o extrato foi recolhido em tubos de Eppendorf os quais foram submetidos a uma centrifugação à 11500 rpm a 0° C por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e utilizado nos ensaios enzimáticos. Para o ensaio da atividade de nitrato redutase pesou-se 200 mg de tecido vegetal fresco de raízes e parte aérea. O material vegetal colhido foi acondicionado em tubos de ensaio e submetido a um meio de incubação constituído de 5 ml da solução tampão de fosfato 0,1M a pH 7,5; n-propanol e KNO₃. A temperatura de todas as vidrarias e soluções utilizadas durante os ensaios foi mantida abaixo de 4° C, em banho de gelo.

b) Ensaio de Nitrato Redutase (NR)

A atividade da NR foi determinada pelo protocolo de Jaworski (1971, citado por Souza, 1995) adicionando-se 4 mL da solução problema; 300 µL de sulfanilamida 1%; 300 µL de η-naftil-etilenodiamino 0,02% e a solução repousou por vinte minutos. Em seguida adicionou-se 4 mL de H₂O destilada, homogeneizou-se a solução e a leitura foi feita em espectrofotometro a 540 nm.

c) Ensaio de Glutamina Sintetase (GS)

Para o ensaio de GS utilizou-se o protocolo de Bergersen (1980, citado por Souza, 1995), adicionaram-se 300 µL do extrato vegetal a 500 µL de um coquetel de incubação constituído de 200 µL tampão imidazol-HCl 0,5M, pH 5,5; 100 µL de 2-β-mercaptoetanol, 100 µL de MgSO.7H₂O 0,4M; 100 µL de hidroxilamina; 100 µL de ATP; 100 µL de glutamato e 100 µL de H₂O. Incubou-se a mistura durante 30 minutos a 30° C, no final do período a reação foi paralisada pela adição de 1,5 mL de uma solução contendo cloreto férrico. Após trinta minutos, a mistura foi filtrada e o quelato

Fe- γ -glutamil-g-hidroxamato (equação 1) produzido na reação foi quantificado espectro-fotometricamente a 540 nm.

d) Ensaio de Glutamato Sintase (GOGAT)

A atividade da GOGAT foi determinada pelo protocolo de Matoh et al., (1980), adicionando-se 100 μ L do extrato vegetal bruto obtido a de um meio constituído de 150 μ L de tampão TRIS-HCl 1M a pH 7,8; 200 μ L glutamina 75mM; 200 μ L de α -cetoglutarato. A reação teve início pelo acréscimo de 300 μ L de NADH 1mM. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo na concentração do NADH nos tempos zero e quinze minutos após a adição deste produto, avaliado espectro-fotometricamente a 340 nm.

e) Ensaio de Glutamato Desidrogenase Aminoação (GDH-A)

A atividade da GDH-aminoação (BERGERSEN, 1980, citado por Souza, 1995) foi determinada adicionando-se 100 μ L do extrato vegetal bruto a um meio constituído de 300 μ L tampão Tris-HCl 1 M a pH 8,0; 100 μ L Na- α -cetoglutarato 0,33M; 100 μ L de NH_4Cl 3M e 2,1ml de H_2O destilada. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 30° C, por quinze minutos, em seguida adicionou-se 300 μ L de NADH 1mM e leu-se a absorbância neste exato momento. Após 10 minutos, fez-se o monitoramento da oxidação do NADH em 340 nm (equação 3).

f) Ensaio de Glutamato Desidrogenase Deaminação (GDH-D)

A atividade da GDH-desaminação foi determinada através do protocolo de Bergersen (1980, citado por Souza, 1995), adicionando-se 100 μ L do extrato vegetal bruto a um meio constituído de 300 μ L tampão Tris-HCl a pH 9,4; 250 μ L glutamato 0,6M e 300 μ L de CaCl_2 . Essa mistura foi incubada em banho-maria a 30° C, por quinze minutos, em seguida adicionou-se 300 μ L de NAD^+ 1mM. Após 10 minutos, o monitoramento da redução do NAD^+ foi realizado em 340 nm (Equação 2).

g) Partição de N.

Determinou-se peso fresco e seco do sistema radicular e parte aérea, o volume radicular.

As frações solúveis foram extraídas pelo método de extração alcóolica conforme Fernandes (1978). O N-total foi determinado no material seco em estufa pelo método Kjeldahl. O N-amônio foi determinado pelo método da reação do íon amônio com fenol alcalino (FELKER, 1977). O nitrato foi determinado por reação sulfossalicílica das amostras (CATALDO et al., 1975). O N-amino foi extraído pelo método de extração alcóolica conforme Fernandes (1978) e sua dosagem foi feita por colorimétrica pelo método da ninidrina (YEMM & COCKING, 1955). Os açúcares solúveis foram determinados pelo método da antrona de Yemm & Wills (1954).

O N-protéico correspondeu ao N-total determinado no resíduo vegetal após a extração alcóolica (FERNANDES, 1974). Sua determinação foi feita por digestão sulfúrica, conforme Tedesco (1982).

4.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.6.1 Partição de N em Plantas

O nitrogênio na planta pode encontra-se nas formas protéica e não-protéica. O N-não-protéico resulta do acúmulo de NH_4^+ , NO_3^- , aminoácidos livres, principalmente das amidas, glutamina e asparagina. O acúmulo de amidas é um mecanismo comum de armazenamento do excesso de N, principalmente quando a síntese protéica está sendo limitada por deficiência de algum fator.

4.6.2 N- NO_3^- nos Tecidos Vegetais

A figura 4-B mostra que houve um efeito significativo ($p=0,05$) da dose de N sob o teor de NO_3^- nas raízes, Aparentemente, parece ter ocorrido um armazenamento de nitrato no vacúolo, em resposta ao período em que a concentração de nitrato estava alta na solução nutritiva. Williams & Miller (2001) relataram, em seu trabalho de revisão, que o influxo de NO_3^- aumenta quando as concentrações de íon são altas no meio de cultivo.

Em adição, Bertin & Gallis (2000 a, citado por Hirel et al. 2001) verificaram a variabilidade genética para acumular NO_3^- foi dependente do nível de N no meio. Os autores encontraram vários QTLs dependentes do nível de fertilidade nitrogenada NO_3^- na solução externa para se expressarem. Uma das constatações dos autores foi que as diferenças na absorção de N eram devidas à eficiência de utilização de N, pois os produtos desse processo fazem parte do mecanismo de regulação da absorção de N.

O nitrato absorvido foi armazenado nas raízes, independentemente da variedade estudada (Figuras 4-B). O mecanismo de acúmulo do nitrato observado nessas variedades ao período de sazonalidade de NO_3^- no meio, poderia ser explorado como potencial de seleção de genótipos para cultivo em solos tropicais.

Quando submetidas ao nível de 200 mg N/L, o N- NO_3^- solúvel apresentou maiores teores nas raízes (Figura 4-B), para todas as variedades, exceção para a Sagrimão que parece não ter respondido ao efeito do aumento de concentração de NO_3^- no meio. As demais variedades apresentaram comportamento bem distinto. Sendo que as variedades Agulha, IAC-25, Comum Branco e Ligeiro apresentaram médias de teores de nitrato significativamente superiores.

É interessante salientar que houve um acúmulo de NO_3^- similar nas folhas em ambos os tratamentos, após um período de nove dias sem N (Figura 5-A). Comparando as figuras 4-B e 5-B, parece que o nitrato presente nas raízes dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200mgN/L foi remobilizado para a parte aérea (Figura 5-A).

É provável que o acúmulo de NO_3^- , nestas condições seja uma predisposição genética de garantia de sobrevivência. De acordo com Hirel et al. (2001), as plantas absorvem e assimilam os nutrientes durante a fase vegetativa e durante a fase reprodutiva, ocorre a remobilização desse N, para assegurar o metabolismo e a formação de novos tecidos envolvidos na sobrevivência das plantas tais como: sementes, bulbos, tubérculos ou trocos (caule). Os autores encontraram uma correlação significativa e positiva entre os teores de NO_3^- e a produção de grãos, em plantas jovens de milho.

É interessante salientar que houve um acúmulo de NO_3^- similar nas folhas em ambos os tratamentos, após um período de nove dias sem N (Figura 5-A). No tratamento de simulação do fluxo sazonal de N (200 mgN/L), no qual o fornecimento de

N foi cortado, a presença de NO_3^- nos tecidos radiculares pode ser uma indicação mais precisa que nesse tecido vegetal o compartimento de NO_3^- é o mais ativo, para essa espécie. Os mesmos resultados podem ser observados no tratamento testemunha (20mgN/L), no qual o fornecimento de N foi mantido. Esses resultados sugerem ser o vacúolo das células radiculares o principal reservatório de NO_3^- nitrato das plantas de arroz estudadas. As variedades Ligeiro e a cultivar IAC-25 apresentaram tendência a acumular N-NO_3^- em folhas, independentemente da dose de N no meio (Figura 3-A e 4-A).

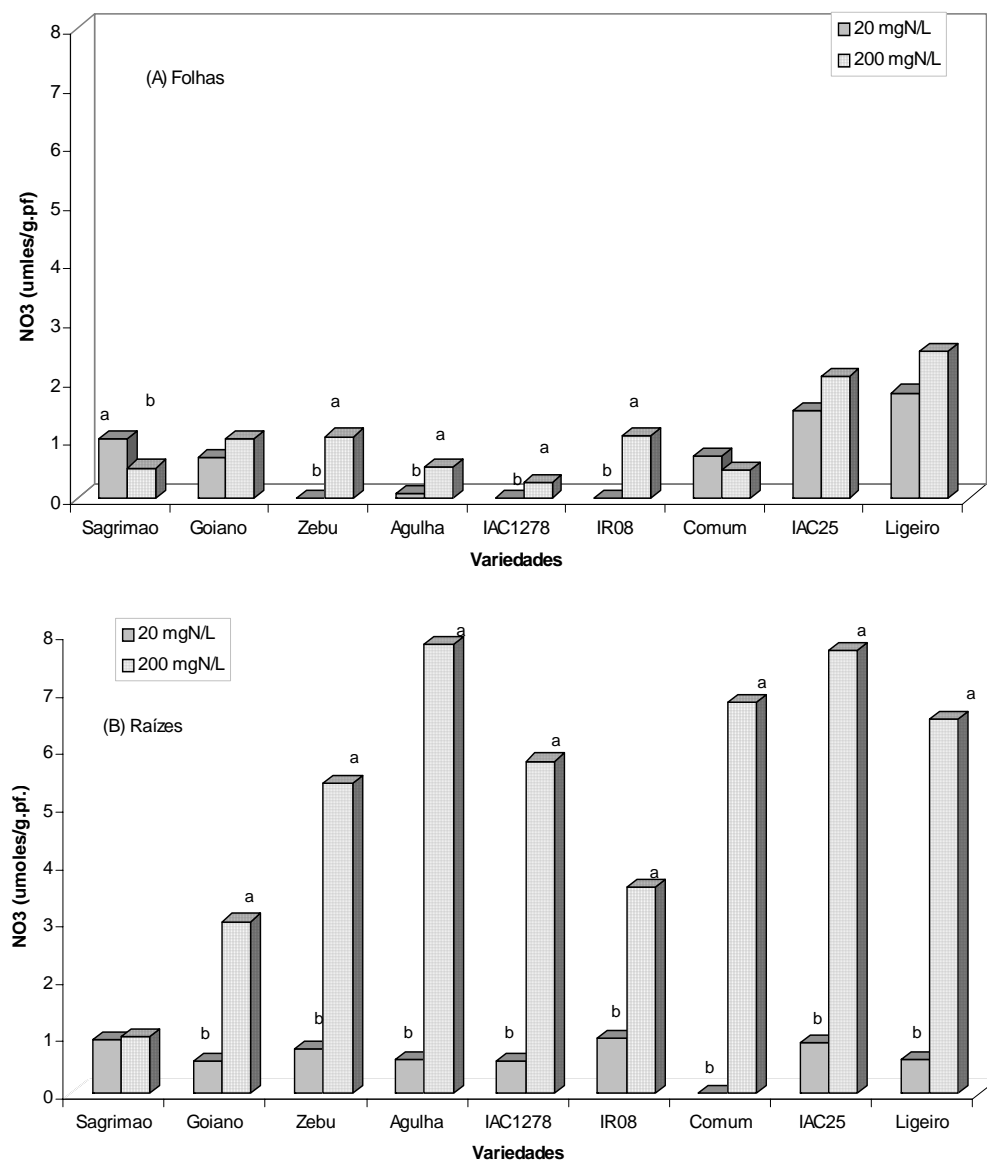


Figura 4. Concentração de NO_3^- em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (62 dias após a emergência).

Pelas figuras 4 e 5 de concentração de nitrato nas folhas 2 e 9 dias após retirar o N, percebe-se que IAC25 e Ligeiro, aparentemente não sofrem alteração no conteúdo de nitrato, nos dois níveis de N. No entanto as raízes nitidamente acumularam nitrato no tratamento com 200 mg N (aos 2 dias após retirada do nitrato) e aos 9 dias pode ser visto que esse nitrato foi remobilizado das raízes, nas outras variedades, parece que parte está na parte aérea (aos 9 dias após retirado do N), mas não para IAC25 e Ligeiro.

Observando-se a figura 4, parece que após uma absorção intensa de N, ocorreu a redistribuição do nitrato acumulado, indicado pela diminuição do teor de NO_3^- nos tecidos e aumento dos teores de aminoácidos, verificada por correlação negativa (1ª coleta) e positiva (2ª coleta) entre os teores de NO_3^- e amino-N livres nos tecidos (Tabela 4 e 5). Essa observação poderia sugerir que os teores de amino-N estariam exercendo um efeito, se não direto, indireto sobre a redução da absorção de NO_3^- nessas variedades.

A presença de nitrato na parte aérea ou nas raízes poderia estar sendo controlada pela presença de açúcares solúveis disponíveis nesses órgãos como fornecedores de energia e/ou de esqueleto de carbono para redução e assimilação de N, visto que foram constatadas correlações positivas entre as altas concentrações de NO_3^- e as concentrações de açúcares solúveis nestes órgãos (Tabela 4 e 5).

É possível que essa estratégia de acúmulo e redistribuição do nitrato, citada anteriormente por outros autores (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995), seja regulada por um mecanismo de retroalimentação com controle genético sob os processos de redução de NO_3^- e assimilação do N absorvido.

Reportando-se aos dados de atividade de NR obtidos nesse experimento, é possível observar uma relação entre a atividade de NR e a concentração de NO_3^- no meio. Existem relatos que acidificação provocada pelo influxo de NO_3^- e concentração de nitrato do meio intracelular poderia provocar a inibição da atividade NR, que atinge atividade máxima em pH em torno de 6,5 (PEREIRA-NETO, 1989). Esse efeito regulatório do pH e concentração de nitrato sob a atividade de NR é mais expressivo quando o influxo de NO_3^- está sendo dirigido pelo sistema de absorção de NO_3^- de alta afinidade (HATS) (VIDMAR et al., 2000).

4.6.3 N- NH_4^+ nos Tecidos Vegetais

Analisando as figura 6 e 7, observa-se que a concentração de NO_3^- no meio de cultivo afetou os teores de NH_4^+ nos tecidos foliar e radicular das plantas que foram submetidas a 200 mg NO_3^-/L em comparação com as testemunhas. Na cultivar IAC 25 ocorreram os maiores incrementos dos teores de NH_4^+ .

Nas raízes, as concentrações de NH_4^+ foram significativamente superiores nas variedades Agulha, IAC 25, Ligeiro, IR 08 e Comum Branco (Figura 6-B). Na segunda coleta (nove dias após o N ter sido retirado do tratamento de 200mgN/L) não foram observadas diferenças significativas entre as s concentrações de NH_4^+ e as concentrações de NO_3^- na solução (Figura 7-B), para todas as variedades.

Entretanto, Aslam et al. (2001) não observaram diferenças significativas nos teores NH_4^+ em relação a concentração de NO_3^- no meio externo (0,1 e 10 mM).

Em relação ao compartimento de NH_4^+ na planta, observa-se que as variedades Sagrimão, Goiano e Zebu Branco acumularam NH_4^+ , principalmente nas folhas, e as demais variedades, aparentemente, acumularam nas raízes. Esses resultados estão consonantes com os resultados de atividade NR desse experimento, no qual constatou-se que o principal sítio de redução de NO_3^- , na maioria das variedades estudadas, era o sistema radicular.

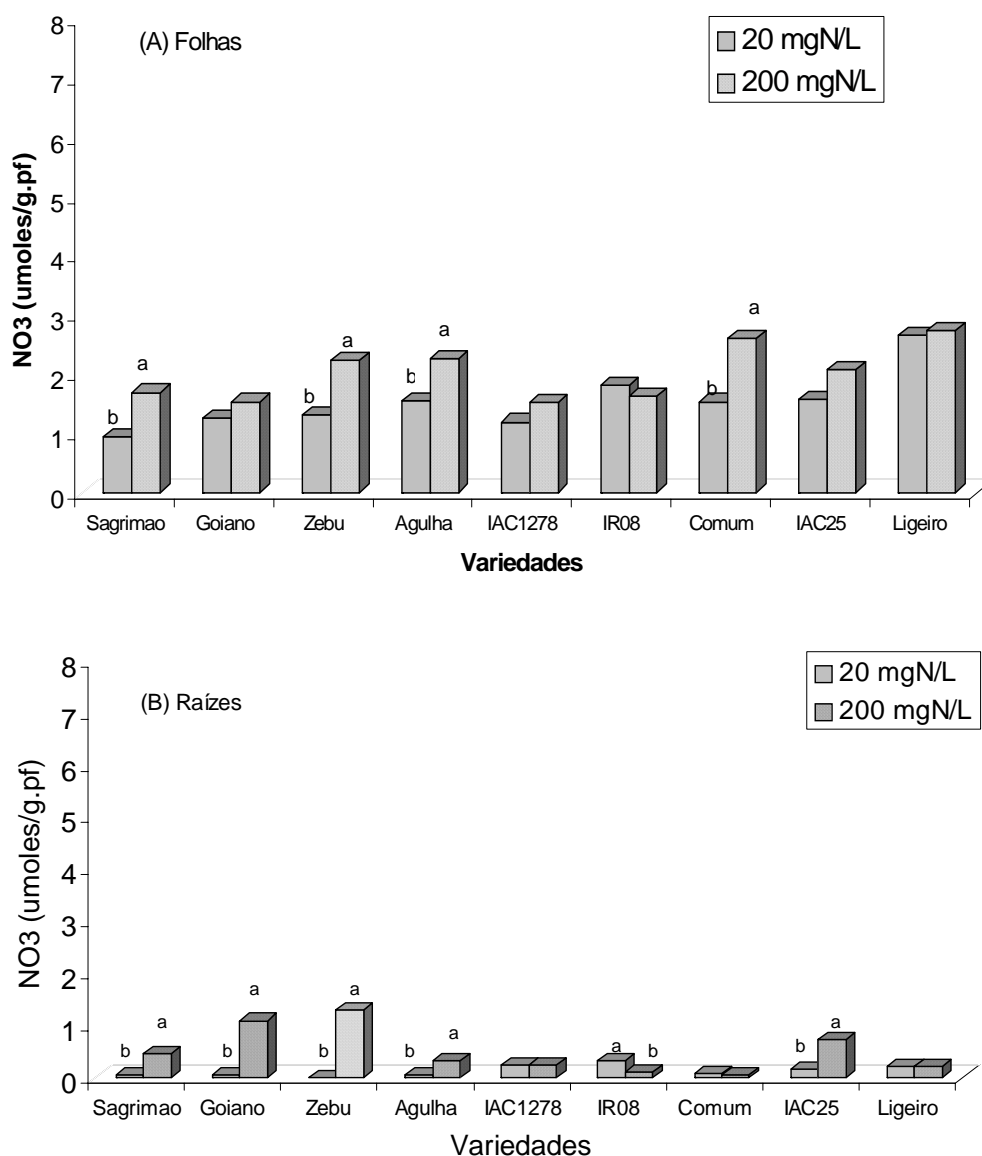


Figura 5. Concentração de NO_3^- em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (69 dias após a emergência).

Nas folhas, observa-se que as variedades Zebu Branco e Comum Branco foram mais responsivas ao aumento da concentração de NO_3^- no meio (Figura 6-A). Na segunda coleta, a concentração de NH_4^+ nas folhas diminuiu em relação a primeira coleta para as variedades Agulha, Zebu Branco, Goiano e Sagrimão (Figura 7-A).

Foram observadas correlações entre os teores de NH_4^+ nos tecidos e a atividade de NR (Tabela 4 e 5). Quanto a atividade de GS houve correlação negativa, em torno de 77%. Esse fato era esperado, visto que, se num determinado tecido vegetal está ocorrendo atividade de GS, o esperado é encontrar maiores quantidades de amino-N nesse tecido. O que foi constatado nesse experimento.

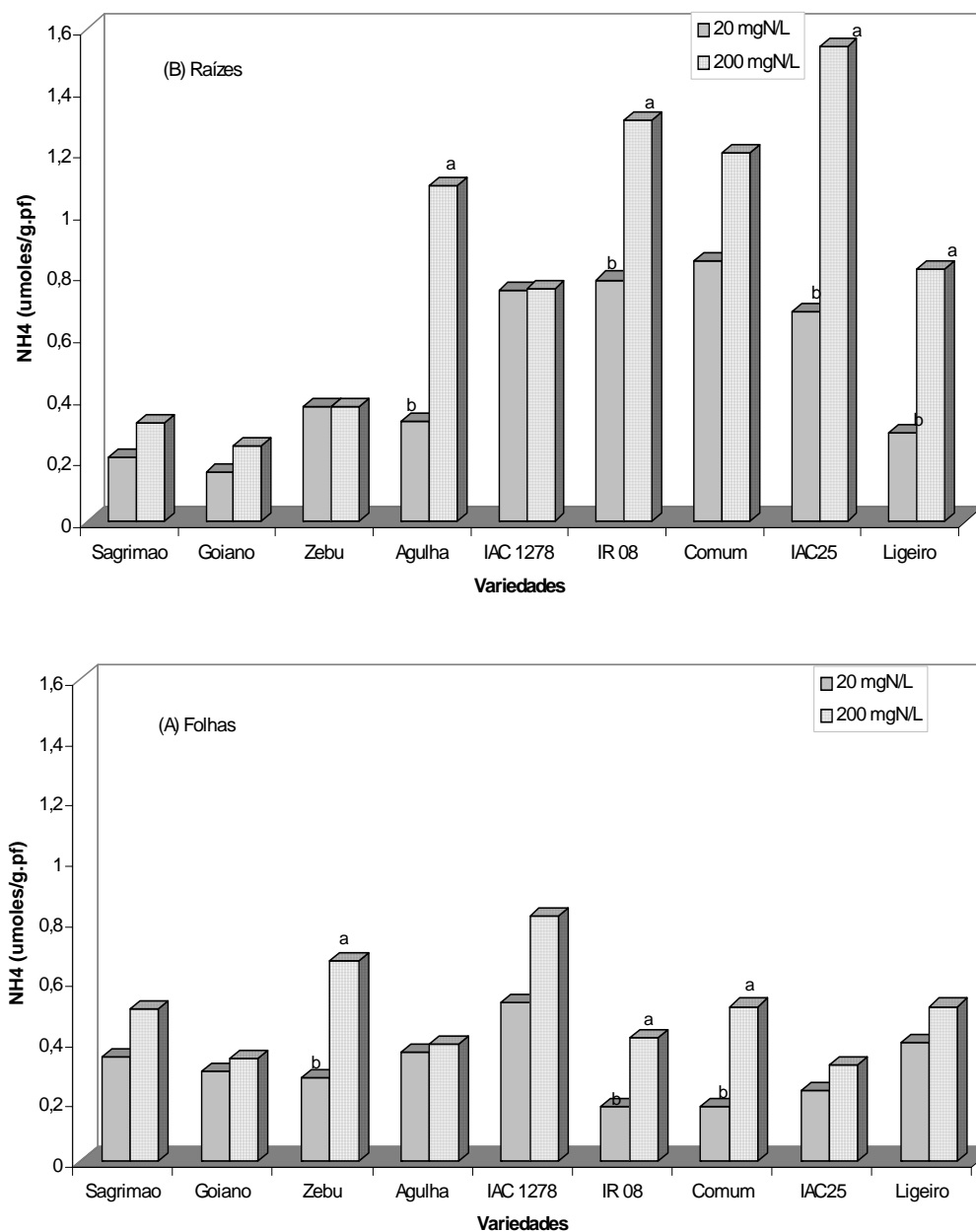


Figura 6. Concentração de NH_4^+ em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (62 dias após a emergência)

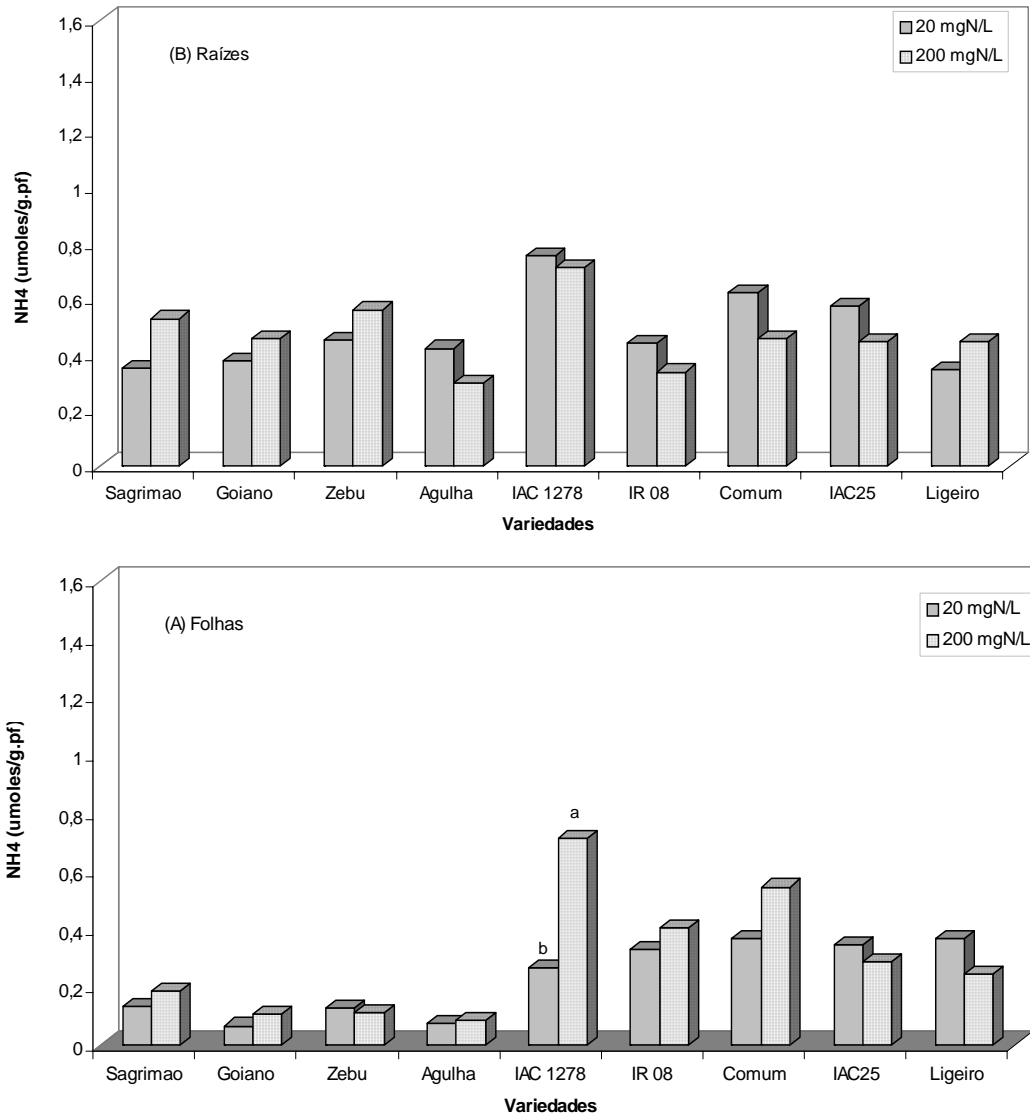


Figura 7. Concentração de NH_4^+ em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (69 dias após a emergência)

Comparando os coeficientes de correlação obtidos entre as concentrações de NH_4^+ e as concentrações de aminoácidos livres e açúcares solúveis nos tecidos e a atividade de GS, observa-se que uma inversão de valores de positivo em negativos com o aumento da concentração de NO_3^- no meio. Esse resultado poderia indicar uma elevada demanda energética utilizada na redução do NO_3^- , o que poderia estar limitando a atividade de GS.

4.6.4 Amino-N nos Tecidos Vegetais

Os maiores teores de amino-N foram observados em tecidos foliares, independente da variedade e da concentração de NO_3^- no meio de cultivo (Figuras 8 e 9). Esses dados estão pertinentes com os encontrados, nesse experimento, para as atividades de GS e GOGAT, onde se verificou ser a parte aérea o sítio de assimilação de NH_4^+ .

As altas concentrações de amino-N observadas nas raízes (8-A e B), poderiam ser resultantes não só da atividade das enzimas da assimilação de NH_4^+ verificadas nesse experimento, mas também poderiam ser resultantes da exportação de amino-N da parte aérea para as raízes. Isso daria suporte a hipótese da ocorrência de síntese de novo de proteínas transportadoras integrantes dos sistemas transportes de NO_3^- .

William & Miller (2001) relataram que os aminoácidos livres presentes nas células exerciam alta influência nos processos de absorção e redução de NO_3^- , podendo ora induzir, ora reprimir esses processos. Segundo os autores, os compartimentos de amino-N presentes em cada tecido vegetal, funcionam como sinal no mecanismo de regulação.

Visando verificar se essa relação estava ocorrendo nesse experimento, foram observadas as correlações entre atividade de NR e teores de amino-N nos tecidos, e constatou-se que havia uma correlação positiva em folhas para ambos os tratamentos e coletas (Primeira coleta: $r = 0,68$ e $r = 0,25$; Segunda coleta: $r = 0,85$ e $r = 0,35$; para doses de 20 e 200 mgN- NO_3^-/L , respectivamente, Tabela 4 e 5). Constatou-se em raízes uma correlação negativa, com exceção do tratamento onde o N foi retirado do meio de cultivo com 200 mgN- NO_3^-/L (Primeira coleta: $r = -0,27$ e $r = -0,41$; Segunda coleta: $r = 0,51$ e $r = -0,53$; para doses de 20 e 200 mgN- NO_3^-/L , respectivamente, Tabela 4 e 5).

4.6.5 Açúcares Solúveis nos Tecidos Vegetais

Os teores de açúcares solúveis em folhas foram significativamente ($p=0,05$) mais elevados que os de raízes (Figuras 10 e 11), em ambas coletas e para todas variedades. Observa-se que o teor de carboidratos mobilizado para as raízes foi maior na variedade IAC-25 e na Ligeiro, nas concentrações de 20 e 200mgN- NO_3^-/L , respectivamente. Possivelmente, esse aumento seja devido à utilização de esqueleto de carbono para a assimilação de N, já que nesta variedade houve uma maior atividade de GS nas raízes. Como as folhas são fontes de carboidratos e as raízes, drenos, os resultados evidenciam essa relação.

Quanto ao efeito do aumento da concentração de NO_3^- em relação a concentração de açúcares solúveis nas folhas (10-A e 11-A), observa-se que as variedades IAC 1278, IR08 e Ligeiro apresentaram aumento, a variedade Comum Branco apresentou queda e as demais não apresentaram diferenças significativas. Segundo Souza (1995), os açúcares solúveis são energia prontamente disponível para redução de NO_3^- ou assimilação de NH_4^+ . A queda na concentração de açúcares solúveis na variedade Comum Branco pode ser um indício de baixa eficiência fotossintética, que poderia limitar o processo de assimilação, e conseqüentemente a eficiência de uso de N. Provavelmente, as altas concentrações de nitrato encontradas nesse experimento nessa variedade sejam devidas a limitação energética ou de esqueleto de carbono.

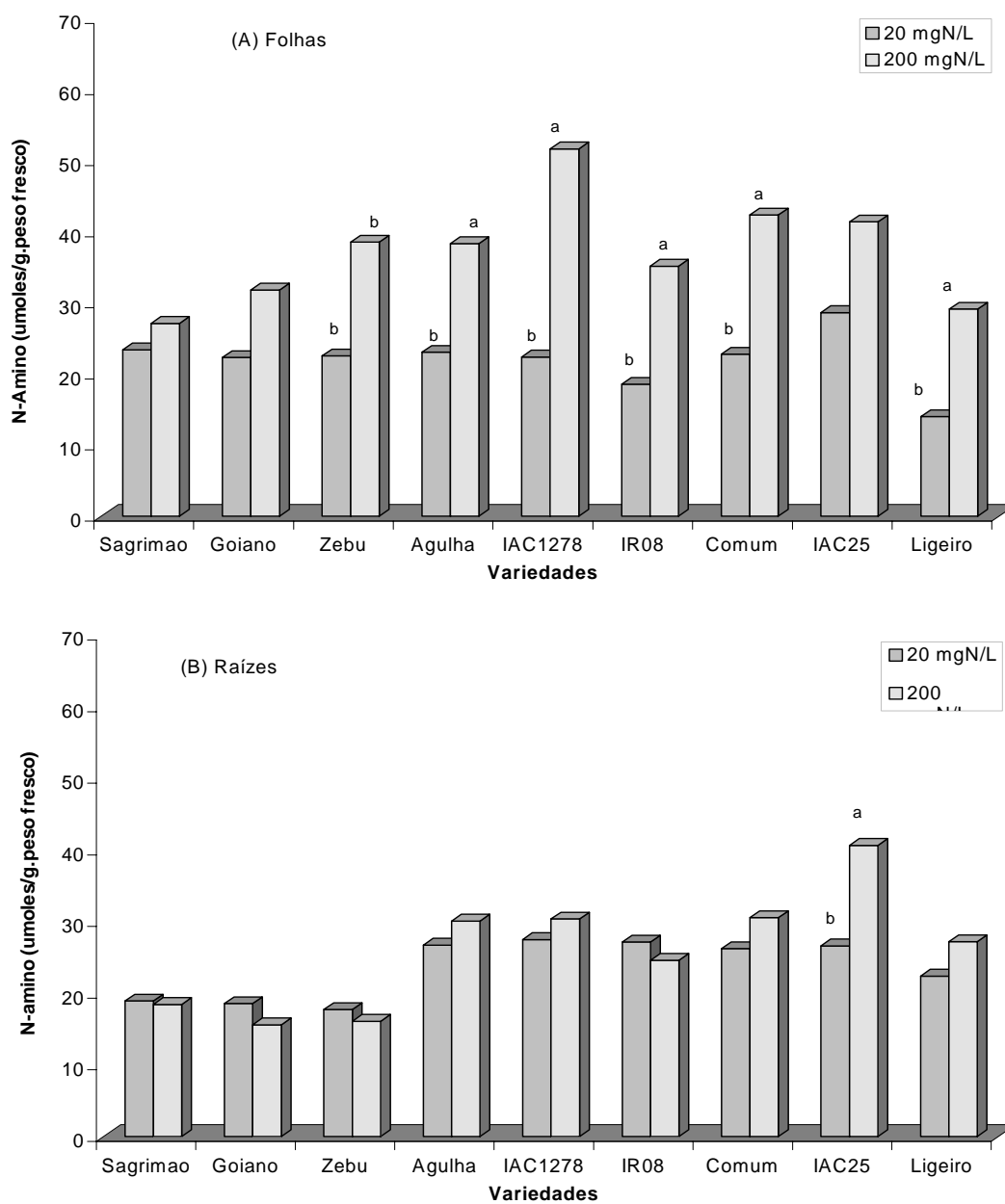


Figura 8. Concentração de amino-N em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (62 dias após a emergência).

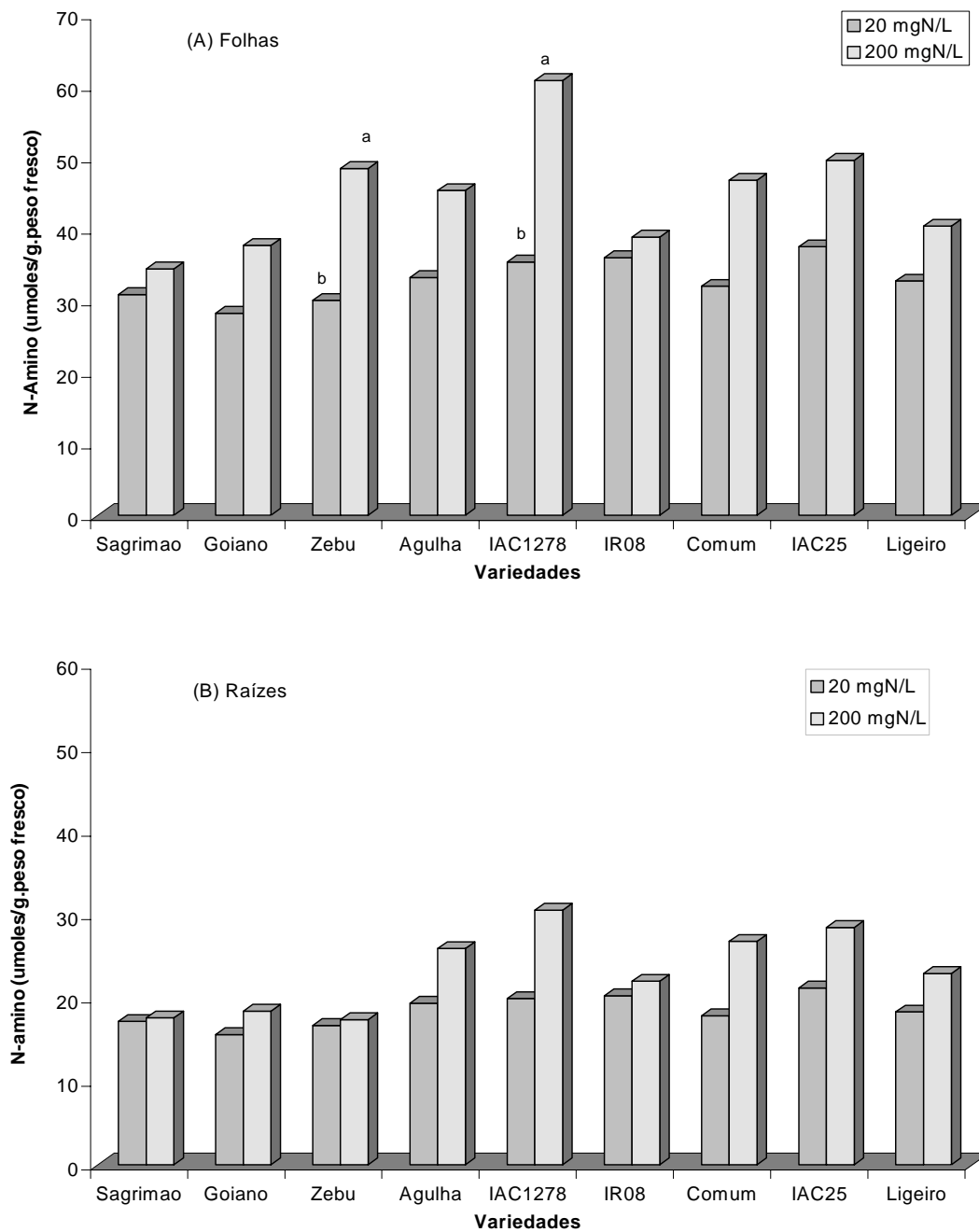


Figura 9. Concentração de amino-N em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (69 dias após a emergência)

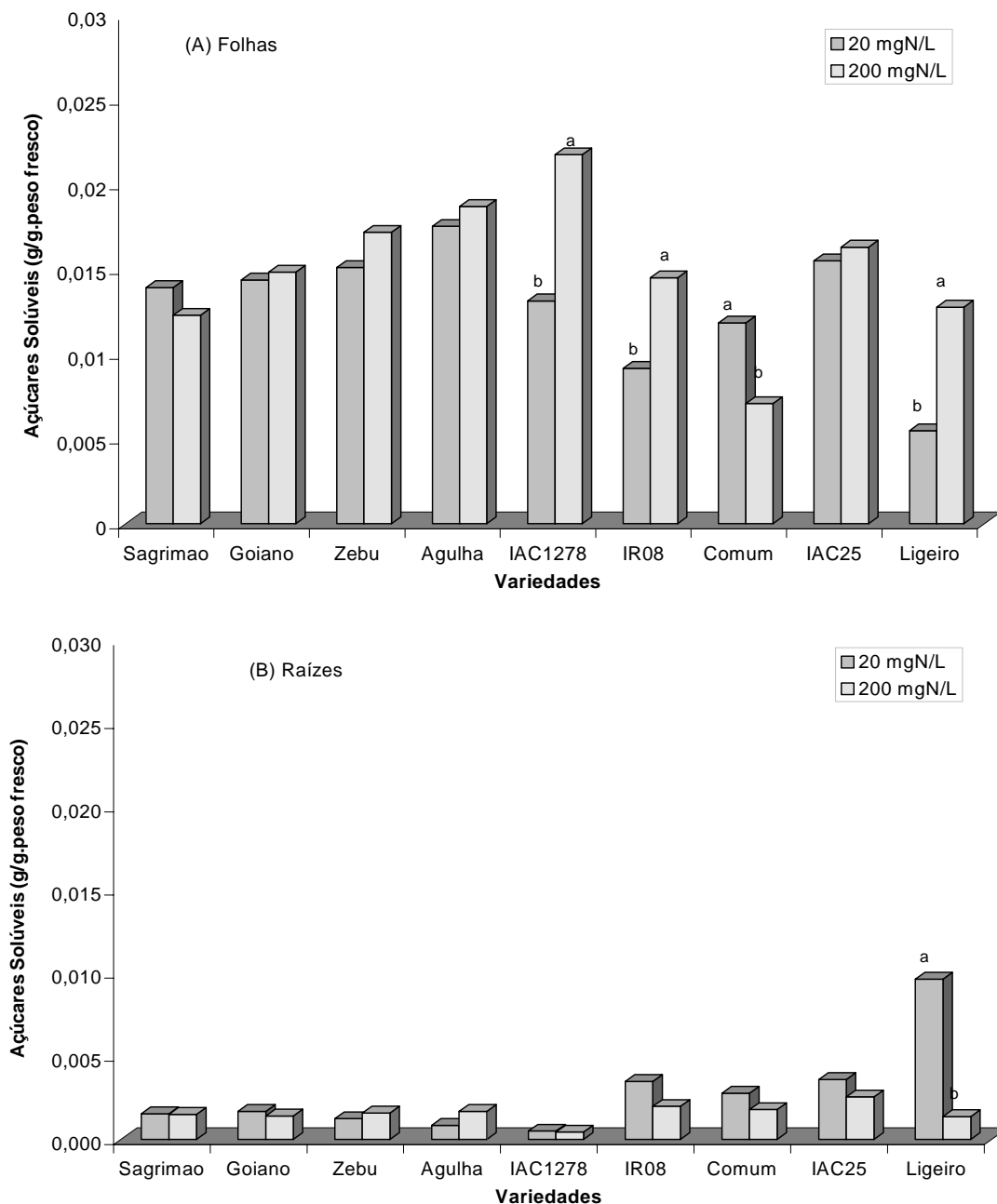


Figura 10. Concentração de açúcares solúveis em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (62 dias após a emergência)

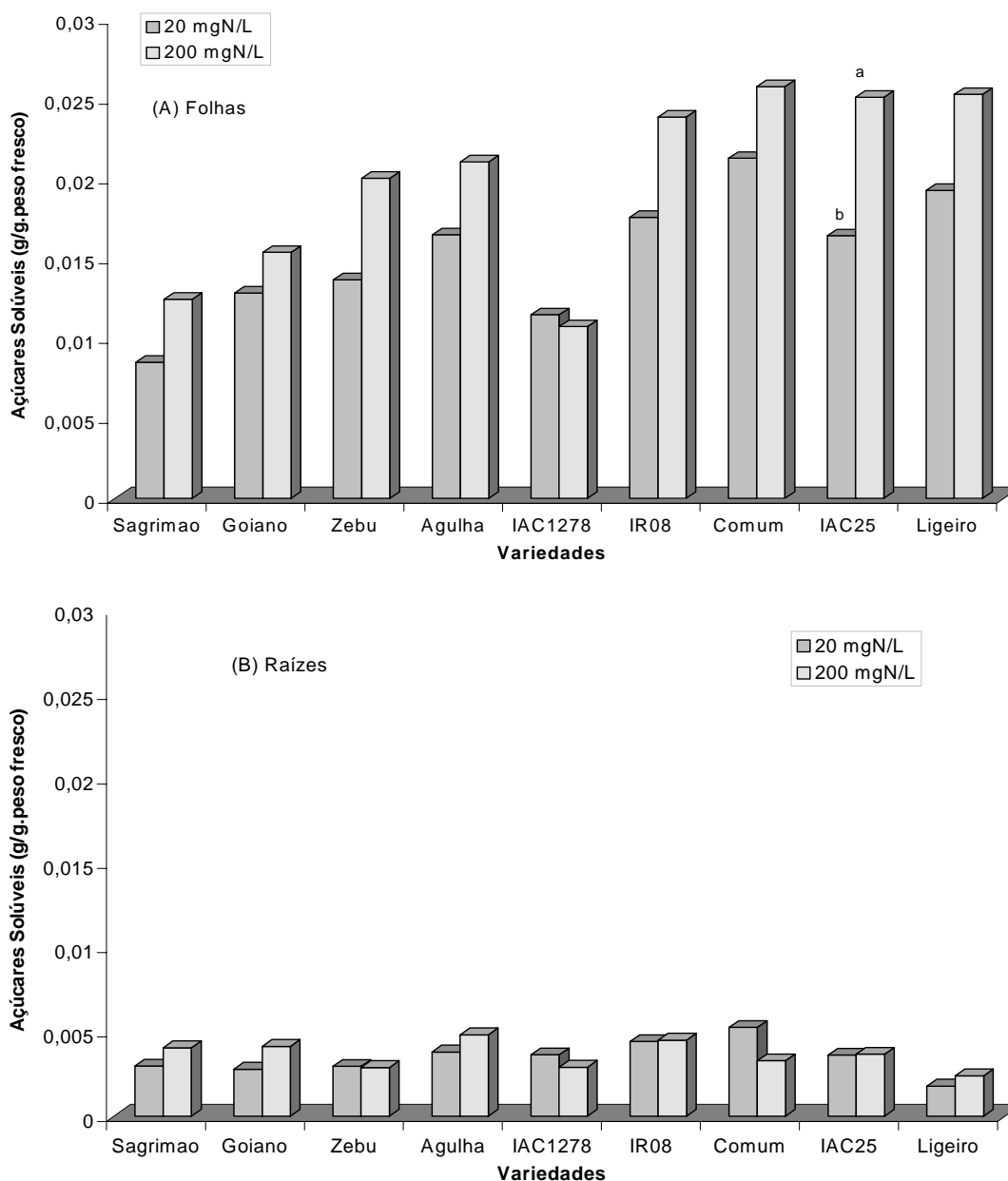


Figura 11. Concentração de açúcares solúveis em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (69 dias após a emergência).

4.6.6 N-Total dos Tecidos Vegetais

Não foram detectadas diferenças significativas para o teor de N-total em função da concentração de NO₃⁻ aplicado e da época de coleta (Tabela 1).

Tabela 1. Teores de N-total, em folhas, caule e raízes de arroz submetidas a aplicação de 20 e 200 mg N/L, simulando o fluxo sazonal de nitrato.

1ª Coleta		N-Total (mg/g ps)				
Parte da planta	Folhas		Caule		Raiz	
Variedade	20mgN/l	200mgN	20mgN/l	200mgN	20mgN/l	200mgN
Sagrimão	3,68	6,07	1,34	2,77	1,63	2,56
Goiano	3,84	6,43	1,17	2,67	1,79	3,04
Zebu Branco	4,04	6,15	1,50	2,80	1,85	2,2
Agulha	4,33	6,04	1,29	2,60	1,96	3,01
IAC 1278	4,65	6,39	2,06	2,62	2,36	2,88
IR 08	4,08	5,56	1,23	2,81	2,29	2,89
Comum Branco	4,61	5,86	1,77	2,99	1,94	2,88
IAC 25	4,71	6,18	1,51	2,67	2,57	2,77
Ligeiro	4,20	6,05	1,46	2,45	2,07	2,47
CV%	7,76		15,33		16,97	
2ª Coleta		N-Total (mg/g ps)				
Parte da planta	Folhas		Caule		Raiz	
Variedade	20mgN/l	200mgN	20mgN/l	200mgN	20mgN/l	200mgN
Sagrimão	3,30	5,65	1,16	2,49	1,53	2,28
Goiano	3,52	6,2	0,94	1,99	1,42	2,68
Zebu Branco	3,96	5,64	1,16	2,27	1,83	1,97
Agulha	4,31	5,72	1,27	2,37	1,76	3,08
IAC 1278	4,98	5,65	2,05	2,27	2,47	2,80
IR 08	3,75	5,07	1,38	1,94	2,39	2,37
Comum Branco	4,42	5,09	1,59	2,38	1,72	2,85
IAC 25	4,64	5,87	1,60	2,37	2,29	2,50
Ligeiro	3,99	5,75	1,60	1,93	1,53	2,31
CV%	8,74		13,42		12,06	

4.6.7 Dados Morfológicos

Não foram detectadas diferenças significativas para peso fresco e seco de parte aérea, raízes e caule e a relação raiz: parte aérea (Tabela 2 e 3). Provavelmente, porque as plantas permaneceram a maior parte da duração desse experimento crescendo nas mesmas condições em casa de vegetação. Apesar disso, observa-se um comportamento diferenciado entre as variedades quanto à produção de fitomassa.

Tabela 2: Peso fresco de folhas, caule e raízes de arroz submetidas a simulação de fluxo sazonal de nitrato.

1ª Coleta		Peso Fresco (g/planta)				
Doses N		20 mgN/L			200 mgN/L	
Variedade	Folhas	Caule	Raiz	Folhas	Caule	Raiz
Sagrimão	13,86	29,69	23,11	15,85	30,67	16,03
Goiano	15,93	35,36	21,30	15,58	32,36	15,14
Zebu Branco	9,73	20,05	16,20	13,20	26,54	13,54
Agulha	11,56	23,26	16,53	11,72	26,00	13,05
IAC 1278	6,94	14,41	11,09	7,49	13,78	7,79
IR 08	9,52	23,41	11,90	15,07	36,03	12,62
Comum Branco	10,91	23,52	14,13	15,54	30,84	15,49
IAC 25	7,44	23,92	9,28	9,39	31,60	10,82
Ligeiro	10,8	29,12	15,37	9,76	24,72	10,70
CV%	21,79	24,73	23,20	21,79	24,73	23,20
2ª Coleta		Peso Fresco (g/planta)				
Doses N		20 mgN/L			200 mgN/L	
Variedade	Folhas	Caule	Raiz	Folhas	Caule	Raiz
Sagrimão	16,90	31,66	24,20	21,67	44,81	22,13
Goiano	17,07	43,11	21,37	28,91	65,48	26,84
Zebu Branco	13,73	29,22	24,02	19,50	41,60	19,45
Agulha	17,94	38,52	28,30	23,78	49,82	24,04
IAC 1278	10,49	24,24	20,30	13,54	31,69	18,96
IR 08	9,93	29,59	15,74	23,48	59,69	21,79
Comum Branco	10,85	26,75	15,80	15,81	34,56	15,78
IAC 25	8,91	34,46	14,55	14,59	67,95	16,76
Ligeiro	11,81	34,46	17,48	17,51	49,29	19,34
CV%	15,56	24,33	17,92	15,56	24,33	17,92

Tabela 3: Peso Seco de folhas, caule, raízes e relação raiz:parte aérea em plantas de arroz submetidas a simulação de fluxo sazonal de nitrato.

1ª Coleta Doses N Variedade	Peso Seco (g/planta)						Raiz: Parte Aérea	
	20 mgN/L			200 mgN/L			20 mgN/L	200 mgN/L
	Folhas	Caule	Raiz	Folhas	Caule	Raiz		
Sagrimão	3,92	4,95	2,93	3,54	4,10	2,03	1,66	1,01
Goiano	3,47	5,45	2,95	3,48	4,12	2,45	1,33	0,96
Zebu Branco	2,11	2,98	2,05	2,88	3,47	1,91	1,64	0,103
Agulha	2,77	3,52	2,21	2,89	3,56	1,98	1,43	1,11
IAC 1278	1,59	2,94	1,21	2,14	2,62	1,01	1,67	1,05
IR 08	2,39	3,15	1,66	4,25	3,72	1,69	1,21	0,83
Comum Branco	2,72	4,17	1,85	4,03	3,47	1,9	1,29	1,01
IAC 25	1,71	3,17	1,13	2,49	6,21	1,27	1,30	1,16
Ligeiro	2,82	5,37	2,07	2,51	3,22	1,72	1,43	1,08
CV%	24,83	23,82	25,19	24,83	23,82	25,19	15,37	15,37
2ª Coleta Doses N Variedade	Peso Seco (g/planta)						Raiz: Parte Aérea	
	20 mgN/L			200 mgN/L			20 gN/L	200 mgN/L
	Folhas	Caule	Raiz	Folhas	Caule	Raiz		
Sagrimão	4,56	5,37	3,33	5,81	2,73	3,07	1,45	1,02
Goiano	4,39	7,45	3,02	7,8	9,96	3,86	1,25	0,93
Zebu Branco	3,57	4,57	0,34	5,2	5,42	2,84	1,75	0,99
Agulha	4,90	6,59	3,96	6,4	6,77	3,34	1,55	1,00
IAC 1278	2,87	4,25	2,33	4,01	4,90	2,13	1,93	1,41
IR 08	2,80	5,77	2,21	7,07	10,39	2,13	1,6	0,93
Comum Branco	3,11	4,49	2,08	4,66	4,82	2,19	1,45	0,99
IAC 25	2,57	7,82	2,05	4,62	11,96	2,51	1,63	1,15
Ligeiro	4,05	10,21	2,73	5,26	8,52	2,67	1,49	1,06
CV%	17,39	21,11	18,34	17,39	21,11	18,34	9,18	9,18

4.6.8 Atividade de NR

Nesse experimento a redução do nitrato parece ocorrer no sistema radicular e na parte aérea, simultaneamente. Todavia, observa-se que a atividade da NR foi maior nas raízes, assim que a dose de 200 mgN/L foi retirada do meio de cultivo (Figuras 12-B e 13-B). Esses resultados corroboram dados da literatura que mencionam a ocorrência de um aumento da atividade de NR quando ocorrem adições de altas doses de NO_3^- ao meio de cultivo (ASLAM & OAKS, 1976, PATE, 1980, PEREIRA-NETO et al., 1989). Segundo Chrispeels et al. (1999) o NO_3^- induz a atividade da NR, sendo que a resposta da enzima a presença de NO_3^- depende de uma enzima constitutiva sensível ao NO_3^- que se liga a regiões regulatórias do gene, estimulando sua expressão.

O sítio de redução de NO_3^- parece depender da disponibilidade dos íons no meio de cultivo e de características genóticas (TRAORE & MARANVILLE, 1999). Traore & Maranville (1999) verificaram que a concentração de NO_3^- não influenciava a atividade de NR, porém constataram um comportamento diferenciado na atividade de NR em relação aos genótipos de sorgo. Em contrapartida, Aslam & Oaks (1976) observaram mudanças no sítio de redução de NO_3^- , quando a disponibilidade de NO_3^- estava baixa no meio de cultivo, a redução dava-se preferencialmente nas raízes; quando estava elevada, a redução ocorria nas folhas.

Quando se analisou a atividade da NR nove dias após ter sido suprimido o fornecimento de N, observou-se que nas variedades melhoradas IR 08 e IAC 25, a atividade nos limbos foliares de NR foi maior, enquanto que nas variedades locais o

sítio de redução de NO_3^- permaneceu nas raízes (Figuras 13). Essas observações podem indicar que essas variedades possuem mecanismos mais eficientes para transportar o nitrogênio nítrico das raízes para a parte aérea. Estudos histoquímicos têm mostrado que a NR pode ser encontrada no citossol, cloroplasto e plasmalema, sendo essencialmente localizada no citoplasma, independente se de células de raízes ou de folhas, pois a coenzima usada pela NR é o NADH e não o NADPH reduzido no cloroplasto (CAMPBELL, 1999).

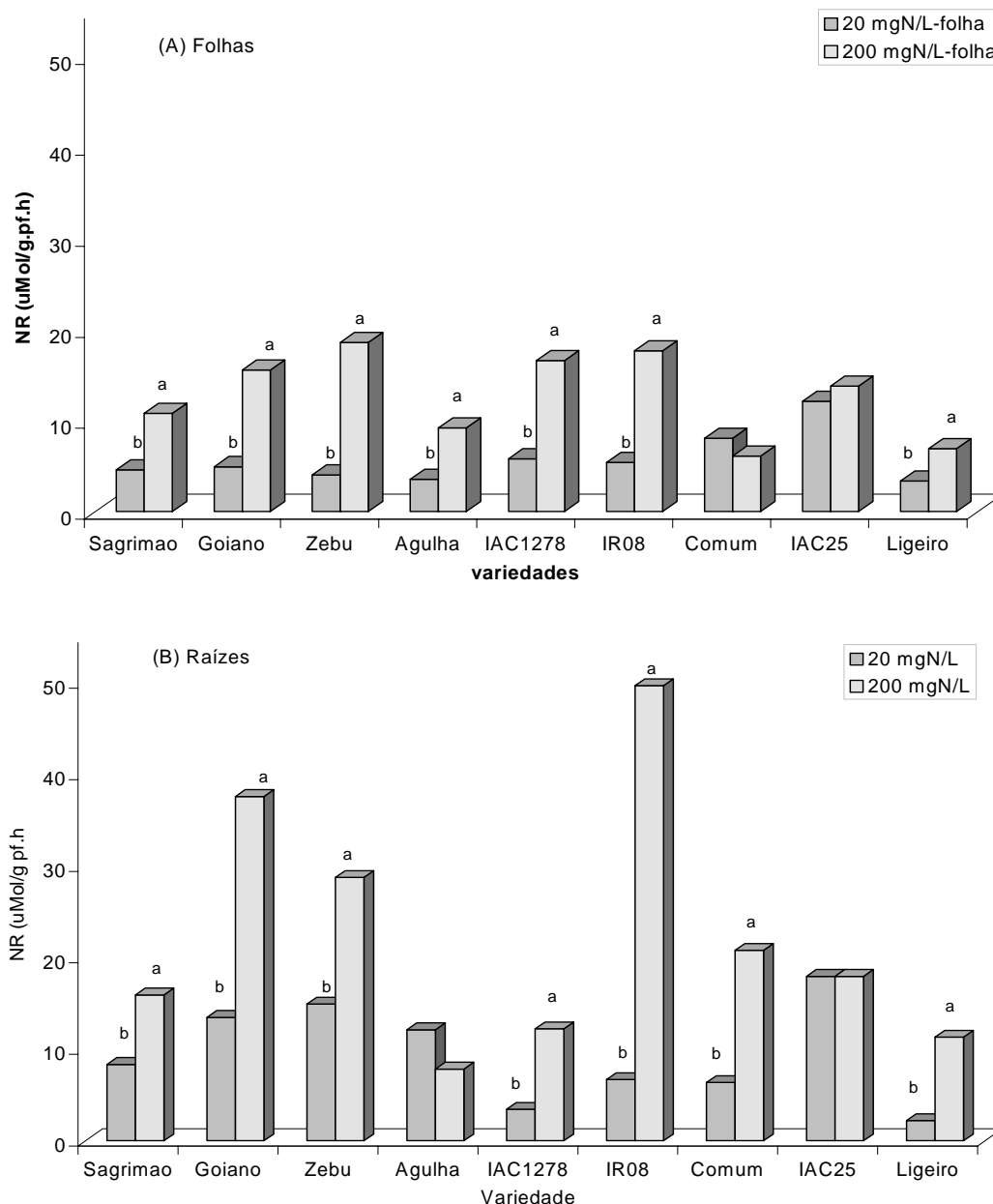


Figura 12. Atividade de Nitrato Redutase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN- NO_3^- /L (62 dias após a emergência)

A detecção, de atividade de NR tanto em folhas e raízes nesse experimento está de acordo com observações constantes na literatura que indicam que os processos de redução de nitrato podem ocorrer nas folhas e nas raízes, de maneira simultânea ou não,

de acordo com a espécie (ASLAM & OAKS, 1976). Aparentemente, em arroz não existe um sítio específico de redução de NO_3^- , muito embora observa-se que em baixas concentrações de N no meio de cultivo, o sistema radicular tendeu a ser o principal sítio de redução. Ao contrário, Lemos et al. (1999) avaliando o efeito de diferentes proporções de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ sob a atividade de NR em seringueira constataram que o processo de redução de nitrato foi exclusivamente em raízes, independente da concentração externa de NO_3^- , esses dados corroboram a hipótese que o local da redução do NO_3^- é inerente ao genótipo (ASLAM & OAKS, 1976).

Na Figura 12, pode-se observar que a atividade de NR, principalmente nas variedades melhoradas IAC 1278 e IR08 foi significativamente maior nas folhas. Em relação as variedades melhoradas, esses resultados evidenciam o tipo de seleção feita sob o paradigma da revolução verde, que adotava como base o melhoramento genético acompanhado por aplicações crescentes de fertilizantes nitrogenados (TEIXEIRA JR., 1999). Possivelmente, esse melhoramento indiretamente selecionou genótipos com menor afinidade pelo substrato – maior K_M -, provavelmente esses genótipos eram os que possuíam sistemas de transporte de nitrato de baixa atividade (LATS) mais eficientes.

A maior atividade da NR observada nas folhas das variedades locais (Sagrão, Goiano, Zebu e Agulha) (Figuras 12 e 13), nesta fase do crescimento pode ser um fator positivo no acúmulo de N nos grãos (HIREL et al., 2001).

O aumento da atividade de NR nos tecidos foliares, pode indicar que essas variedades apresentariam um mecanismo genético-fisiológico com capacidade de absorver o NO_3^- do meio externo e armazená-lo em compartimento de reserva, e posteriormente remobilizá-lo para os grãos. Segundo Hirel et al. (2001) o NO_3^- é a principal fonte de nitrogênio na planta que é metabolizada e translocada para produção de grãos.

4.6.9 Efeito da Concentração de NO_3^- Sob a Atividade de NR

Em relação ao efeito da concentração de NO_3^- no meio de cultivo e a atividade de NR (Figura 13 e 14) observa-se que houve um aumento significativo ($p=0,05$) da atividade de NR quando as plantas foram submetidas a concentração de 200 mgN/L, independente do sítio de redução. Segundo estudos realizados por Aslam et al. (2001) doses mais elevadas de NO_3^- adicionadas ao meio de cultivo tende a aumentar a atividade de NR e a quantidade de proteína-NR em diferentes tecidos de folhas e raízes.

Avaliando-se as concentrações de N utilizadas nesse experimento, observa-se que 20 e 200 mgN- NO_3^-/L correspondem, respectivamente, a 0,4 e 4,0 mM de N. A primeira concentração está dentro da faixa de absorção do sistema de transporte de alta atividade (HATS) e a segunda está dentro da faixa na qual a absorção é dirigida pelo sistema de transporte de baixa afinidade (LATS) (VIDMAR et al., 2000; WILLIAMS & MILLER, 2001).

Aparentemente, os metabólitos resultantes da redução e principalmente da assimilação de N estão afetando a atividade de NR através de um controle de retroalimentação. O HATS é um sistema induzido pelo substrato (WILLIAMS & MILLER, 2001). Vale esclarecer que a indução pode ser um estímulo ou inibição ao processo de absorção de NO_3^- ; e o substrato nesse caso pode ser o próprio NO_3^- ou quaisquer produtos originários dos processos de redução ou assimilação de N. O LATS é constitutivo, e portanto é muito pouco afetado por esse controle. Provavelmente, a maior atividade de NR nos tratamentos com 200 mgN/L, seja devido a pouca influência da alta concentração de NO_3^- no meio sob a absorção do NO_3^- , sugerindo que nesta concentração a absorção de NO_3^- seja, predominantemente, dirigida pelo LATS.

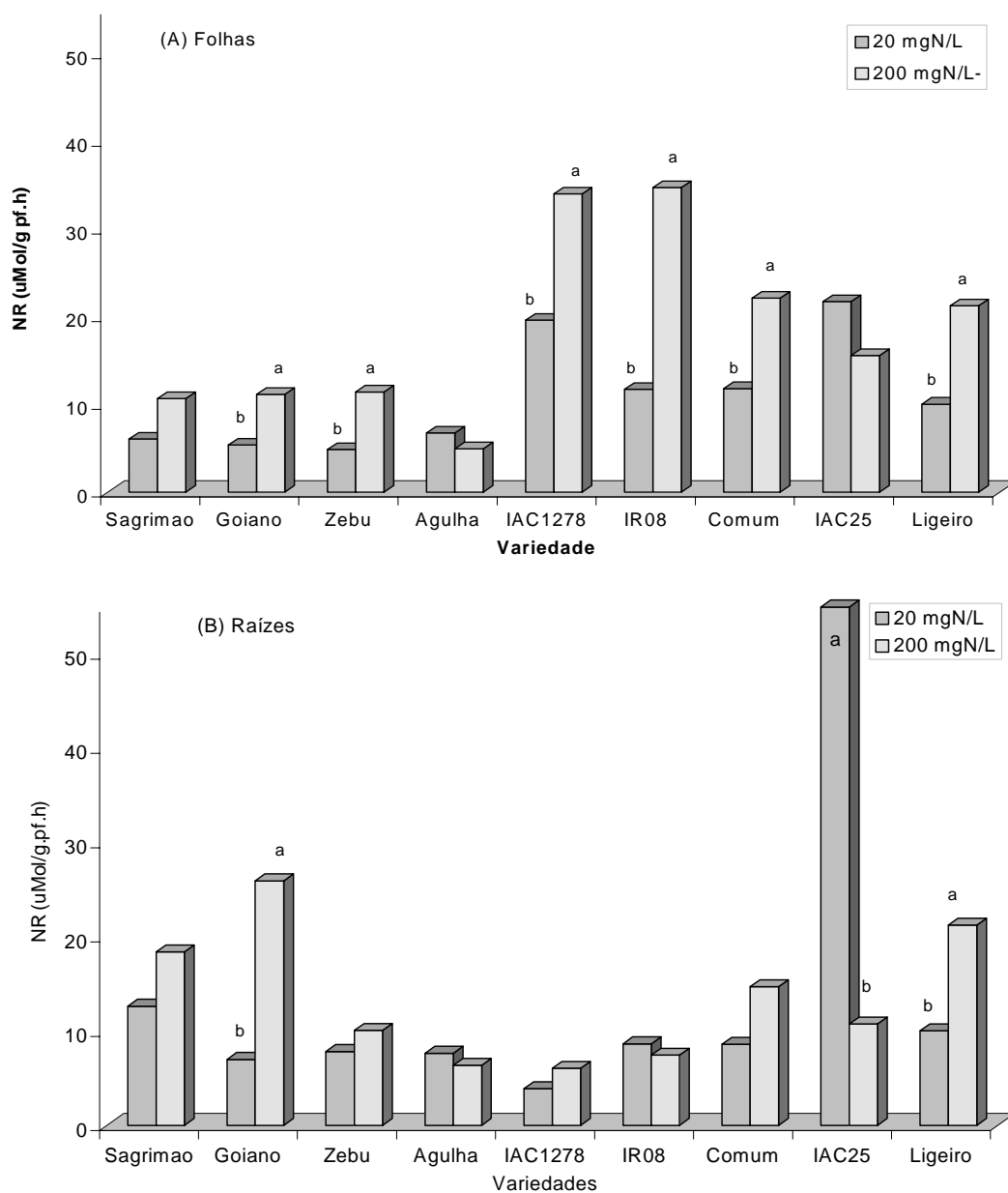


Figura 13. Atividade de Nitrato Redutase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (69 dias após a emergência).

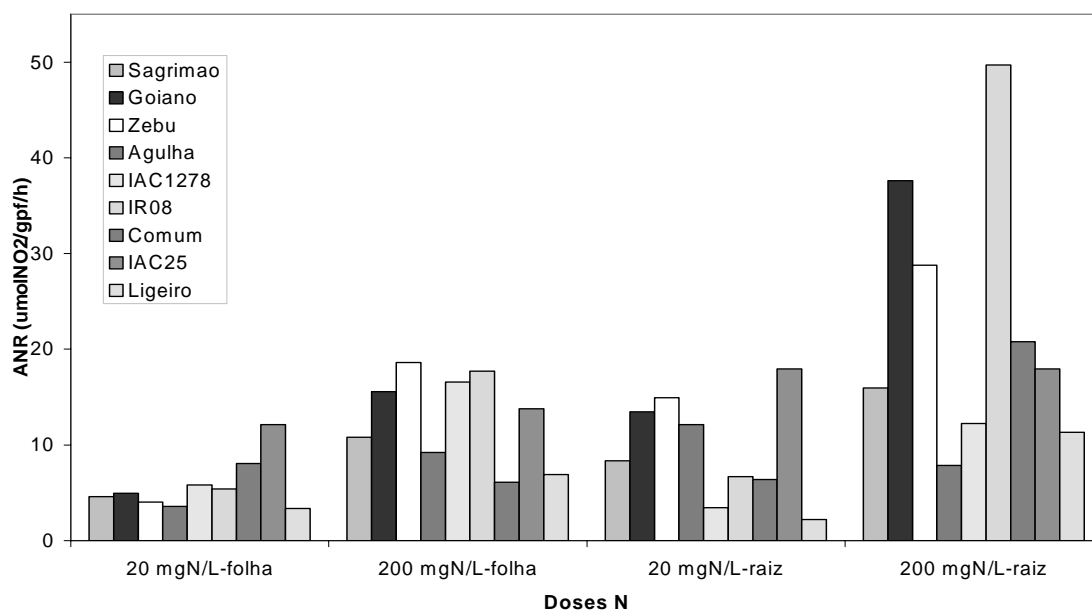


Figura 14. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de NR em folhas e raízes de plantas de arroz, sob duas doses de NO_3^- , 20 e 200 /L, dois dias após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200 mgN- NO_3^- /L.

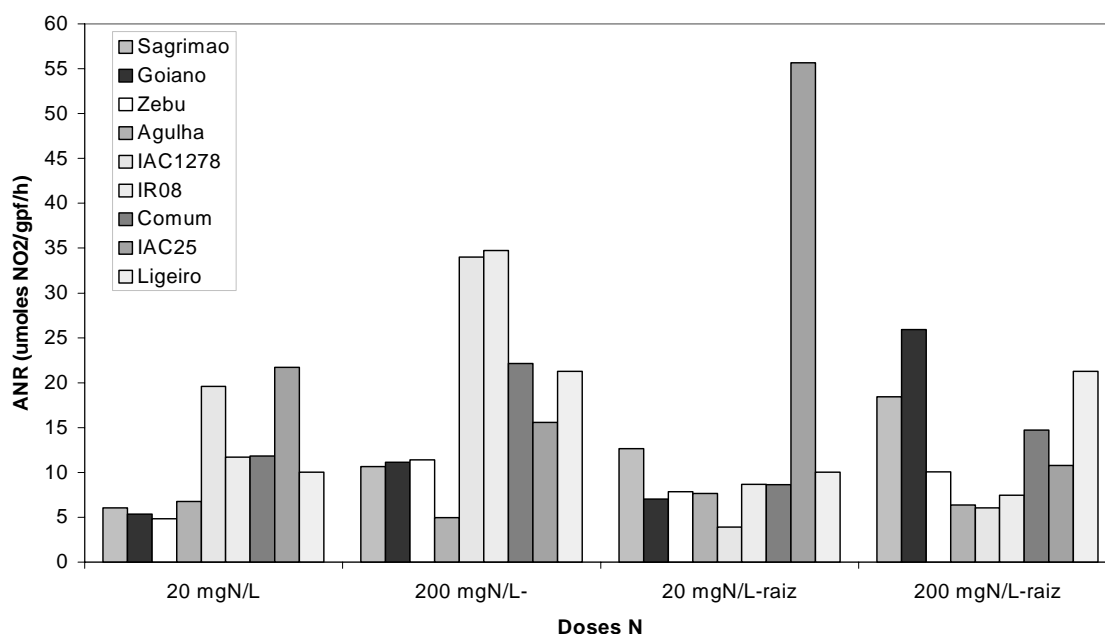


Figura 15. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de NR em folhas e raízes de plantas de arroz, sob duas doses de N 20 e 200 mg/L, nove dias após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200 mgN/L.

Em um experimento para avaliar o efeito diferencial do teor de aminoácidos sob a absorção de NO_3^- em cevada, Aslam et al. (2001) concluíram que quando a absorção era dirigida por IHATS, havia a atuação de um mecanismo de regulação do influxo de NO_3^- através das raízes; porque as taxas de absorção do NO_3^- pelo sistema radicular das plântulas sob nutrição com NO_3^- a 10 mM na presença de aminoácidos eram similares àquelas com 0,1 mM NO_3^- em sua ausência. Levando em consideração os sistemas de absorção, os autores concluem que a regulação do HATS poderia ser um limitador da

disponibilidade de N no meio quando a concentração de NO_3^- for baixa, e que em altas concentrações de N no meio essa limitação não ocorreria.

Resultados similares foram obtidos por Vidmar et al. (2000) numa investigação sobre a regulação dos genes HvNRT2, que codificam os transportadores do HATS em raízes de cevada, na presença e ausência dos aminoácidos asparagina, aspartato, glutamina e glutamato, NH_4^+ , e inibidores da assimilação de N. Eles observaram que o aumento da quantidade dos aminoácidos decrescia o influxo de NO_3^- , e quando um inibidor da assimilação de N estava presente no meio de cultivo esse fato não era observado.

Visto que em alguns solos da região tropical possuem ca capacidade de retenção de nitrato por período de tempo, aumentando a disponibilidade de N, a pesquisa de genótipos eficientes em absorver NO_3^- é de extrema importância, para manutenção de uma agricultura sustentável, com aproveitamento deste potencial, reduzindo ao mínimo a agressão ao meio ambiente pela adição de fertilizantes nitrogenados.

Diante do exposto, aparentemente, as variedades locais Goiano, Zebu Branco e Agulha juntamente com a cultivar IAC 25 apresentam potencial para serem recomendadas para cultivadas nas condições de fluxo sazonal de nitrato.

4.6.10 Atividade de GS

Como pode ser visto nas figuras 16-A e 17-A as atividades da Glutamina Sintetase foram baixas nas raízes, em comparação com as atividades observadas nas folhas (Figura 15-B e 16-B), independente da variedade estudada. Segundo Grossman & Takahashi (2001), existem nas folhas duas isoformas de GS, uma conhecida como GS1, presente no citosol e outra, GS2, presente nos cloroplastos. O papel da GS2 é assimilar o amônio produzido a partir da redução do nitrato, enquanto o da GS1, aparentemente está ligado à resposta a alta concentração de amônio no citossol (GROSSMAN & TAKAHASHI, 2001).

Com exceção da variedade Zebu branco, nas demais variedades estudadas a atividade da GS nas raízes foi responsiva à concentração de NO_3^- fornecido na solução nutritiva. Sukanya et al. (1994), conduziram um estudo de avaliação da GS em tecidos de folhas e raízes de milho em relação a presença de NO_3^- e NH_4^+ no meio externo. Eles verificaram que quando NO_3^- e NH_4^+ estavam presentes na solução, observava-se um aumento na atividade de GS, porém quando as plantas eram nutridas com NO_3^- havia uma redução acentuada da atividade de GS. Dados similares foram observados em raízes para atividade de GS durante a segunda coleta (Figura 16).

Mifflin & Lea (1977), em revisão sobre o metabolismo de N em plantas, relataram que o efeito do fornecimento de NO_3^- às plantas sob a atividade de GS poderia ser positivo, negativo ou nulo, dependendo da espécie estudada ou das condições ambientais, visto que essa enzima sofre regulação de agentes do meio ambiente, tal como a luz. Em adição, eles comentaram que a presença da atividade radicular de GS poderia ser uma indicação da presença de níveis tóxicos de NH_4^+ nas células desse tecido.

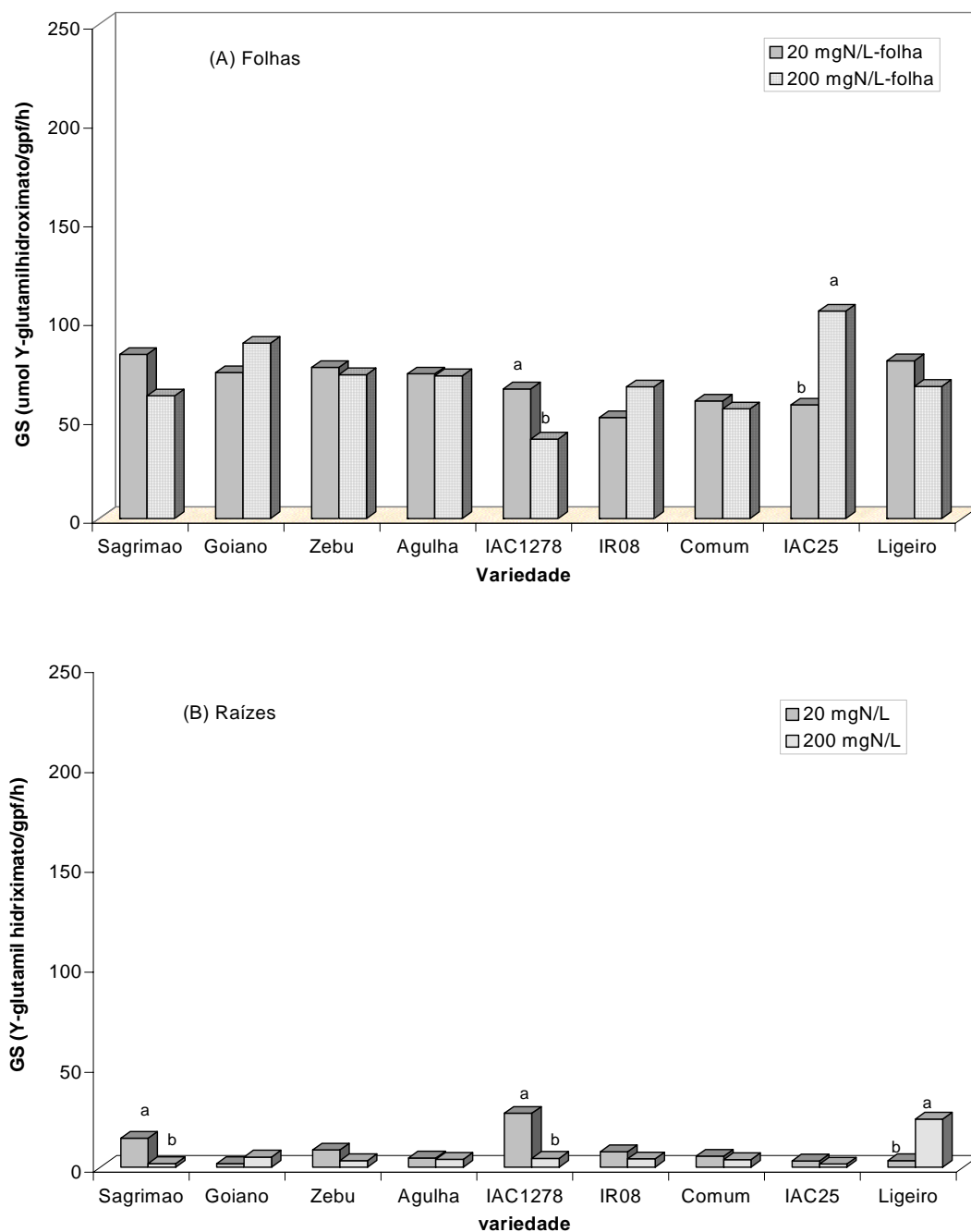


Figura 16. Atividade de Glutamina Sintetase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (62 dias após a emergência)

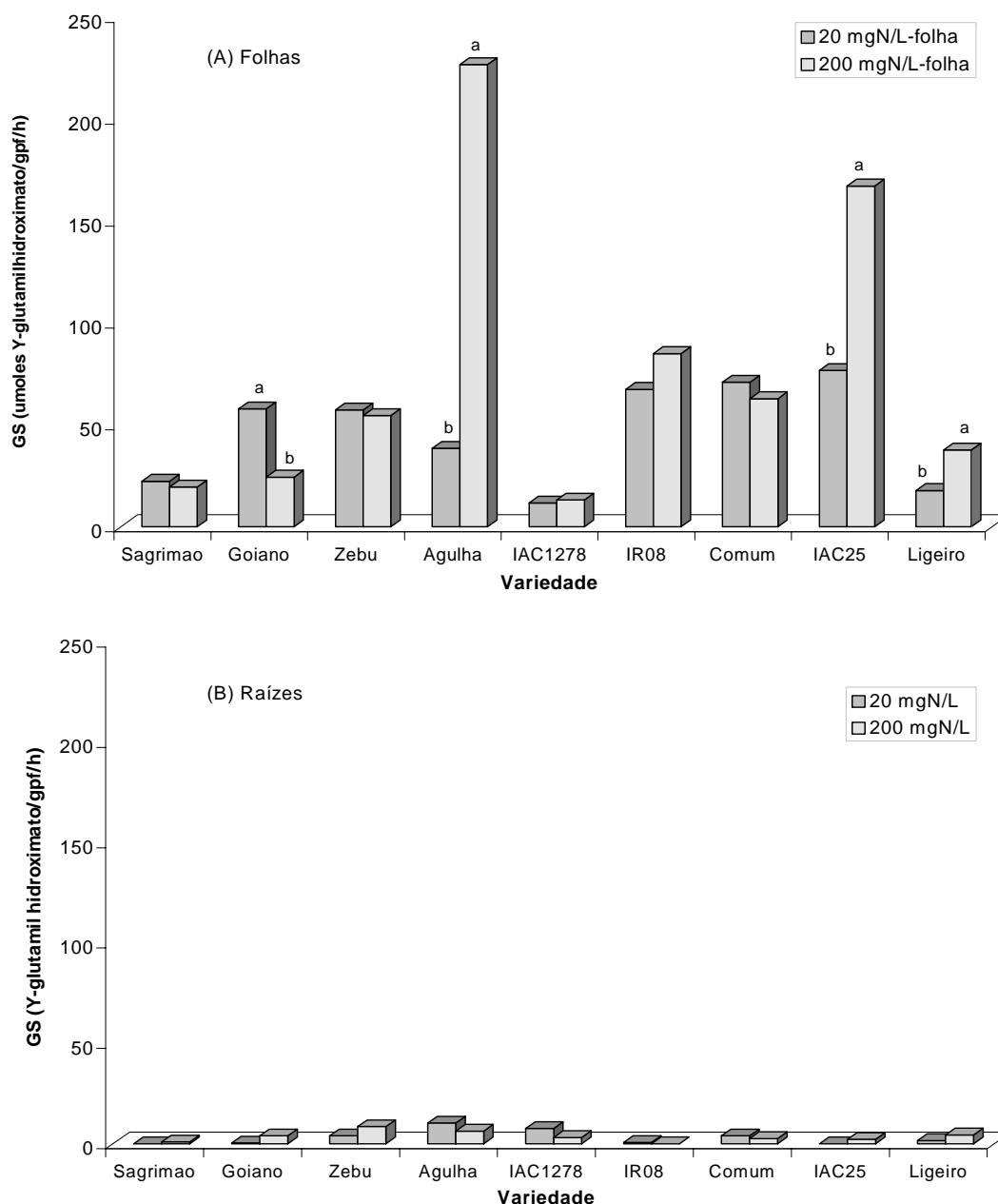


Figura 17. Atividade de Glutamina sintetase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (69 dias após a emergência)

Foi observado um efeito diferenciado na atividade da GS nas folhas na segunda coleta (Figura 12). Na segunda coleta onde se supõe esteja havendo redistribuição do NO₃⁻ acumulado nos tecidos vegetais (observado em plantas que tiveram o suprimento de N cortado - 200 mg NO₃⁻ /L), a atividade de GS se mostrou indiferenciada entre os tratamentos, com exceção nas variedades Goiano, Agulha e IAC 25. As maiores atividades de GS observadas nas folhas (Figura 12), nove dias após o fornecimento de N-NO₃⁻ ter sido suprimido, podem ser resultantes do fornecimento de N reduzido na parte aérea pela NR ou pelo transporte de N reduzido para os tecidos foliares. Apesar da cultivar IAC 25 ter apresentado uma diferença significativa em relação a atividade de

GS durante a primeira coleta, quando o fornecimento de NO_3^- foi de 200 mg NO_3^- /L, as demais variedades obtiveram atividade de GS similares (Figura 15).

Observando os coeficientes de correlações obtidos entre a atividade de GS e as concentrações de NH_4^+ e de açúcares solúveis nos tecidos foliares, parece que a atividade de GS, nas condições desse experimento, sofreu uma grande influência desses compostos, possivelmente, NH_4^+ e de açúcares solúveis nos tecidos sejam os componentes principais do mecanismo de regulação de GS (Tabela 4 e 5).

Comparando-se a atividade da GS com a atividade de NR observa-se que um comportamento distinto entre as enzimas, sugerindo que, nessas variedades de arroz sob as condições desse experimento, a redução do NO_3^- pode ser tanto nas folhas e nas raízes; e assimilação primária do NH_4^+ acontece particularmente nas folhas (Figura 17).

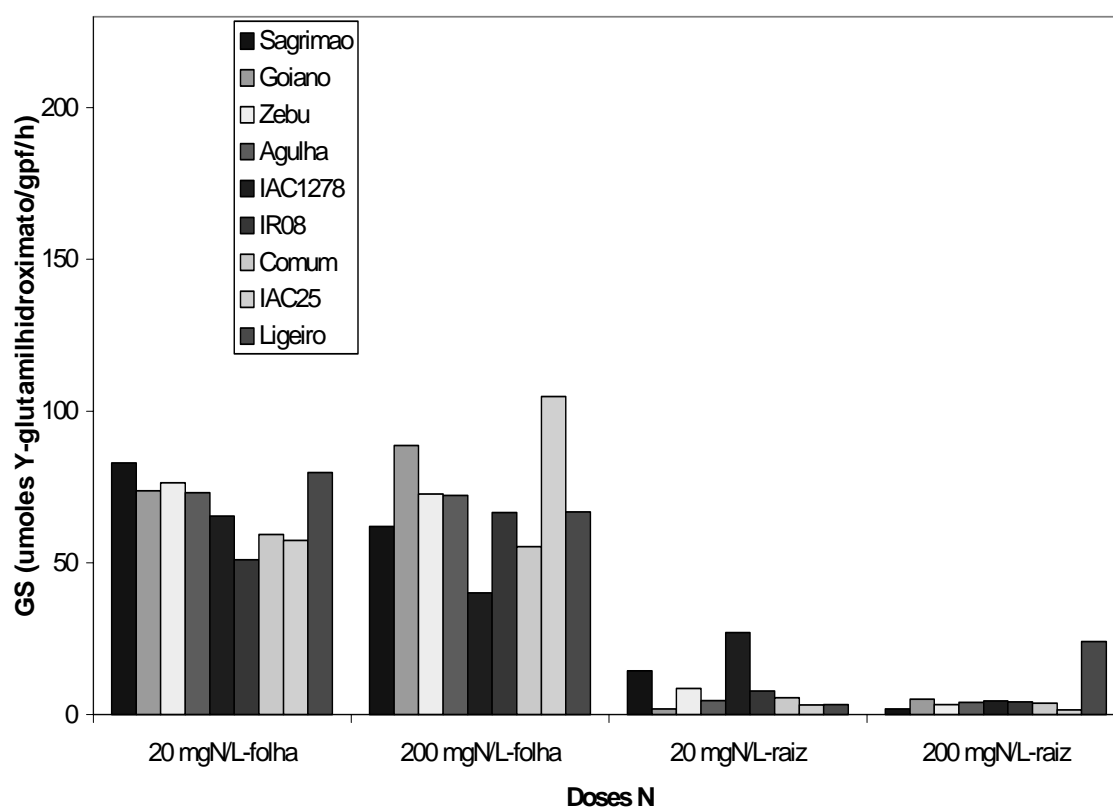


Figura 18. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de GS em folhas e raízes de plantas de arroz, dois após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200mg NO_3^- /L (62 dias após a emergência).

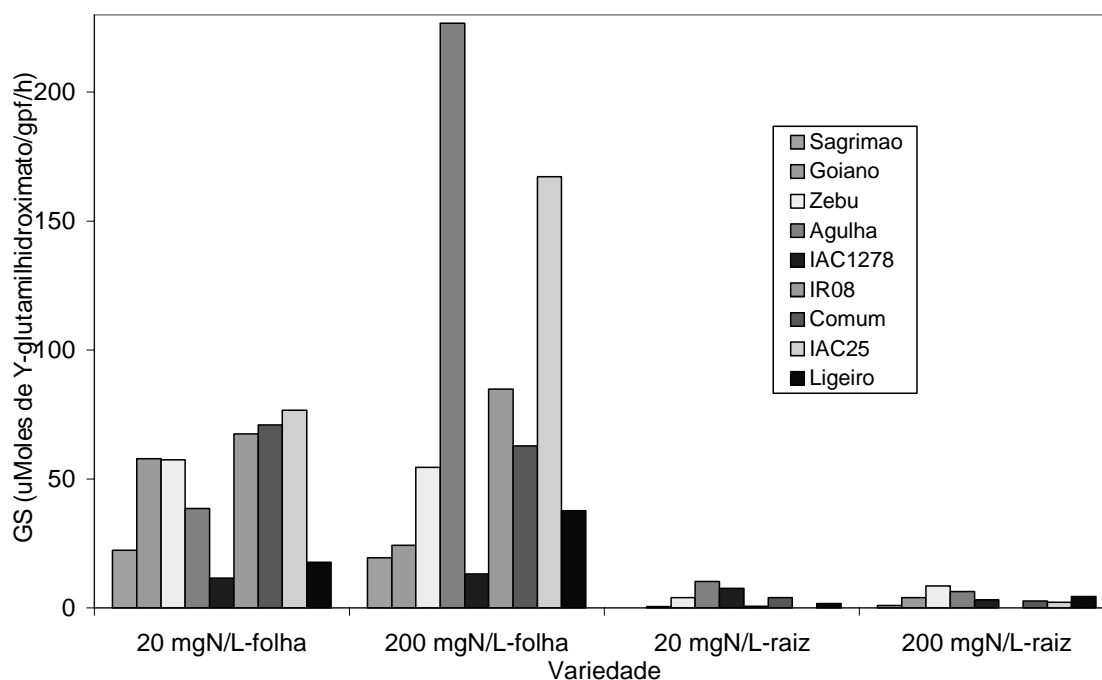


Figura 19. Efeito da concentração de nitrato sob a atividade de GS em folhas e raízes de plantas de arroz, nove dias após ter sido suprimido o fornecimento de N do tratamento de 200mg NO₃⁻/L (69 dias após a emergência).

4.6.11 Atividade de GOGAT

A atividade da GOGAT, dois dias após ter sido suprimido o N do tratamento 20 mgN-NO₃⁻/L foi significativamente maior nas folhas, de ambos os tratamentos, com exceção das variedades Sagrimão, Goiano e Zebu Branco (Figuras 20 e 21).

As variedades locais Sagrimão, Goiano, Zebu Branco e Ligeiro junto com a variedade melhorada IAC 1278 apresentaram resultados significativamente ($p=0.05$) maiores para a atividade radicular da GOGAT, na primeira coleta (Figura 18-B). Na figura 19, estão representados os dados da segunda coleta, nas variedades locais Sagrimão, Goiano, Zebu Branco verifica-se que a atividade de GOGAT aumentou expressivamente. O aumento de atividade na segunda coleta, nessas variedades locais, também foi verificado em folha (Figura 21).

Em plantas de arroz com 26 dias de idade, Yamaya et al. (1995) verificaram aumentos da atividade de NADH-GOGAT, principalmente nas raízes em função do incremento de N no meio de cultivo, e também da forma de N.

O aumento da atividade de NADH-GOGAT, nessas variedades locais de arroz, quando as plantas estavam nove dias sem N no meio de cultivo, poderia ser uma indicação da ação de um mecanismo adaptativo, pois a GOGAT é uma enzima ativa não só no processo de assimilação com também no processo de reassimilação do amônio produzido pela degradação de compostos nitrogenados presentes na célula e durante a fotorrespiração (TREPP et al. 1999).

Baron et al. (1994), em cloroplasto isolados de células foliares de cevada analisando o controle metabólico do ciclo da GS/GOGAT, observaram que quando a atividade de GOGAT era inibida as taxas de assimilação foram muito afetadas, o mesmo efeito não foi atribuído a GS. Eles concluíram ser a GOGAT a etapa limite do ciclo de GS/GOGAT. As demais variedades mostraram pequeno aumento da atividade radicular de GOGAT, exceção para Agulha (Figuras 20-B) e a diminuição da atividade

foliar de GOGAT, quando as plantas estavam 9 dias sem N no meio de cultivo (Figura 21-A).

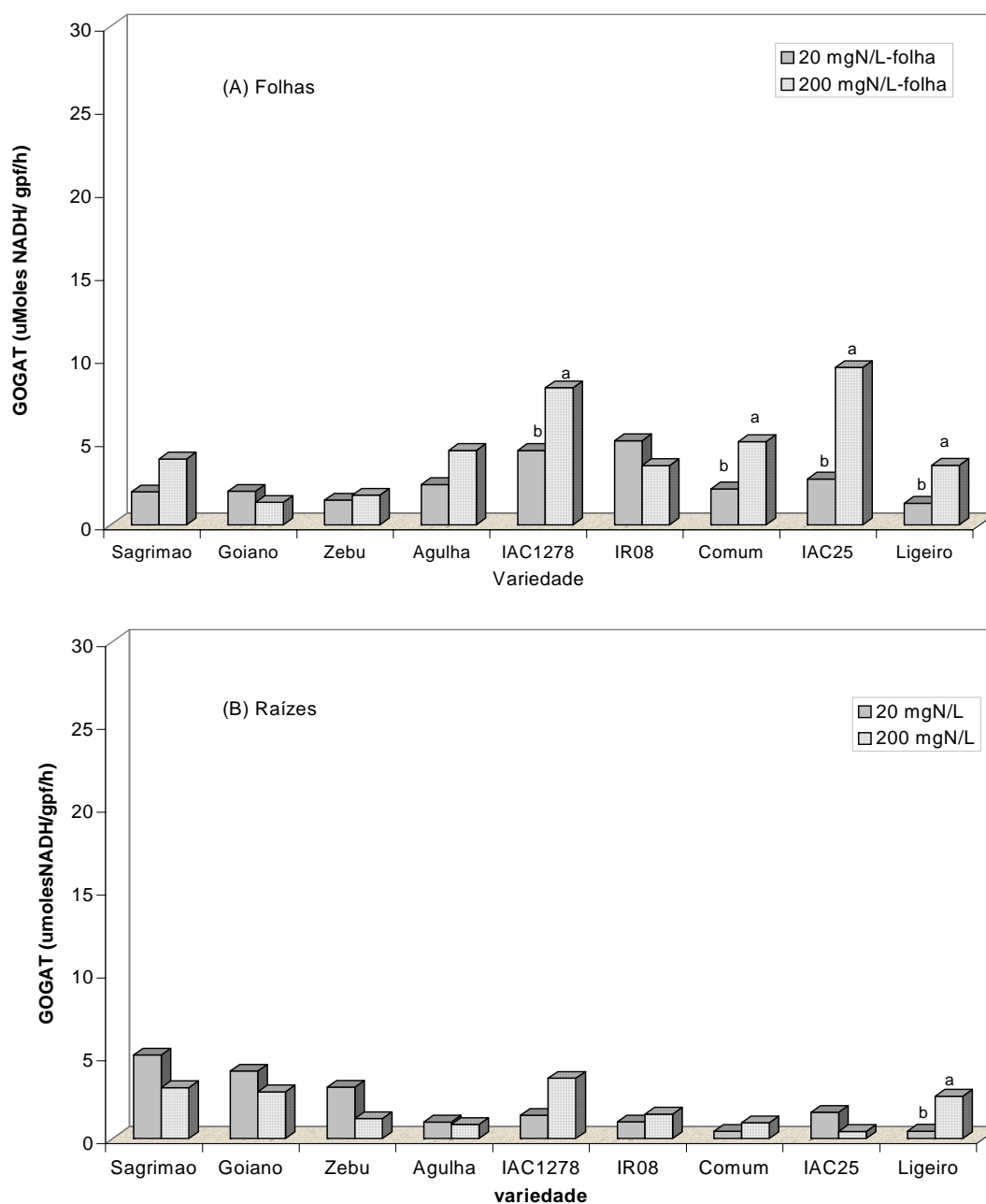


Figura 20. Atividade de Glutamato Sintase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (62 dias após a emergência)

Os dados mostraram correlação negativa entre as concentrações de NH₄⁺ nos tecidos de raízes e a atividade de NADH-GOGAT, em torno de 60%, para ambos tratamentos (20 e 200 mgN-NO₃/L), e não se verificou correlação entre atividade de NADH-GOGAT e concentrações de NH₄⁺ na parte aérea. Ao contrário dos resultados encontrados por Watanabe et al. (1996), que estudando a expressão de NADH-GOGAT em suspensão de células de arroz encontraram altas correlações entre a concentração de

NH_4^+ no meio celular e atividade de NADH-GOGAT. Os autores mencionaram que Yamaya et al. (1995) encontraram resultados semelhantes, estudando o efeito da concentração de NH_4^+ em plântulas de arroz, entretanto ao estudar folhas de arroz, a correlação foi negativa. Portanto, pode-se inferir que o efeito da concentração de NH_4^+ nas células sob a atividade de GOGAT depende do estágio de desenvolvimento da planta.

Observou-se, também correlação negativa entre as concentrações de amino-N nos tecidos e a atividade de NADH-GOGAT em torno de 60% e 30%, para os tratamentos com 20 e 200 $\text{mgN-NO}_3^-/\text{L}$, respectivamente.

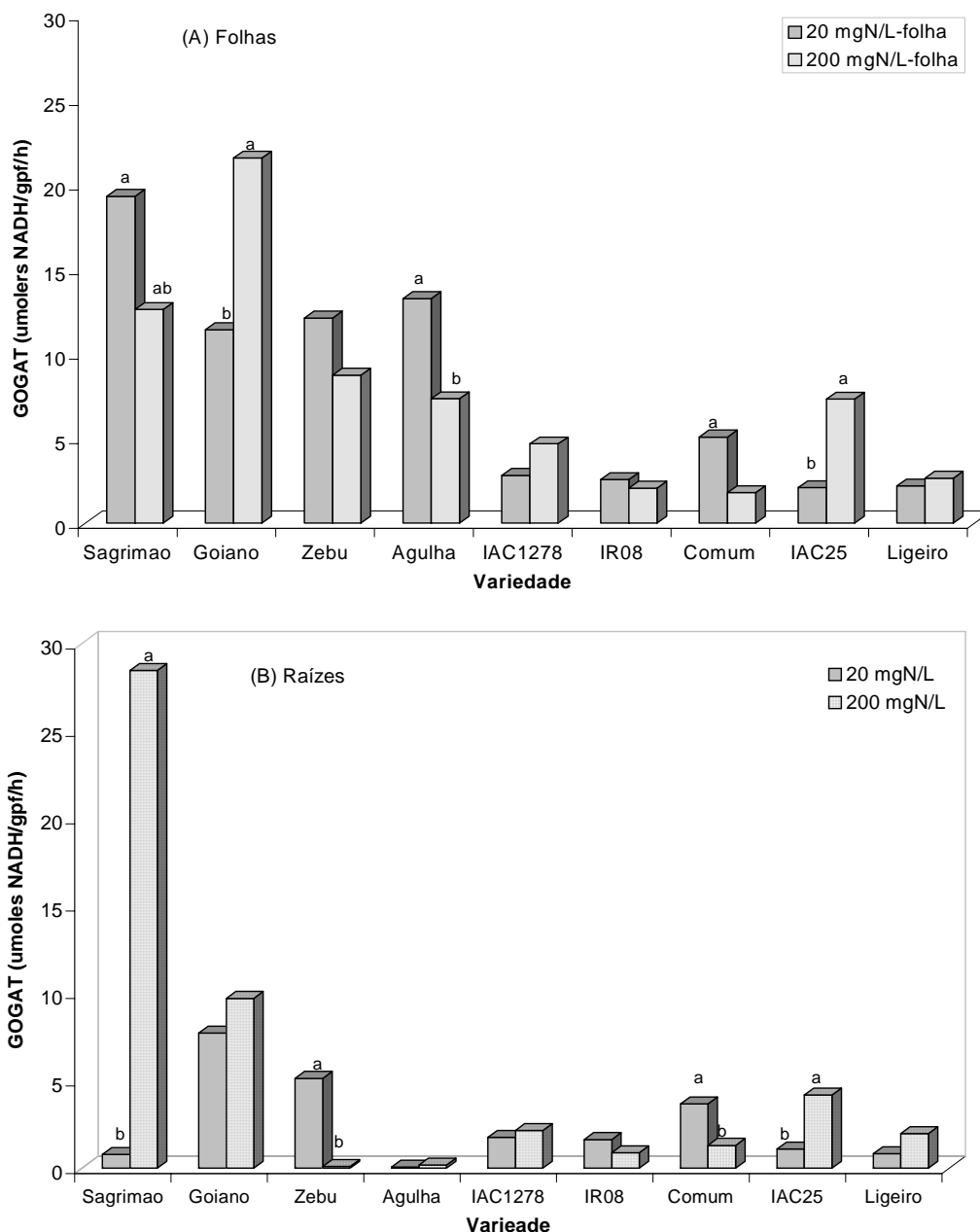


Figura 21. Atividade de Glutamato Sintase em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 $\text{mgN-NO}_3^-/\text{L}$ (69 dias após a emergência)

4.6.12 Atividade de GDH-A

A atividade de GDH-A foi pouco expressiva nos tecidos radiculares dessas variedades durante a primeira coleta (Figura 22). Não sendo constatada em tecidos radiculares das amostras da segunda coleta (nove dias após o fornecimento de N do tratamento de 200 mgN-NO₃⁻/L ter sido cortado) (Figura 23).

Nas Figuras 22 e 23, observa-se a atividade de GDH-A em folhas. Houve um aumento da atividade de GDH-A na segunda em relação à primeira coleta. Em comparação a atividade de GS, verificada nesse experimento, a via GDH foi responsável, aproximadamente, por 20% do processo de assimilação do NH₄⁺.

Segundo Fernandes e Rossiello (1995) a presença de atividade de GDH durante o metabolismo de N está associada a quantidades elevadas de amônio nos tecidos vegetais. De acordo com os autores a indução da atividade GDH é acionada em situações de baixa disponibilidade de esqueleto de carbono.

A ação conjunta das rotas de assimilação de GDH e GS/GOGAT, principalmente nos tecidos foliares pode indicar, que possivelmente, um mecanismo de correção de níveis tóxicos de NH₄⁺ esteja em ação em função de quantidades expressivas de NH₄⁺ presente na parte aérea, geradas pela redução de NO₃⁻ nas folhas e nas raízes e carregadas para a parte aérea para assimilação, visto que foi constatado que esse é o principal sítio de assimilação nas variedades em análise.

Como o arroz, preferencialmente, absorve o N na forma de NH₄⁺, a indução da atividade de GDH, seja pelos altos teores de NH₄⁺, ou seja pela limitação de esqueleto de carbono, o que nesse caso específico provavelmente não parece estar acontecendo (dados de açúcar solúveis na parte aérea), a colaboração da via GDH para produção de amidas parece ser uma estratégia para evitar toxidez de NH₄⁺.

Apesar da atividade de GDH-A sofrer o efeito da concentração de NO₃⁻ no meio, além do efeito da variação genotípica, a fase de desenvolvimento das plantas, nesse experimento, parece ser o fator determinante para a indução de GDH. A presença de NH₄⁺ nos tecidos (dados apresentados na próxima seção) parece não ter influenciado diretamente a atividade de GDH. Provavelmente, por ser essa enzima compartimentalizada na mitocôndria das células dos tecidos. Esse fato deve ser um dos fatores que contribui, possivelmente, para a baixa afinidade dessa enzima pelo substrato.

É relevante mencionar que a GDH utiliza como cofatores o NADH (coenzima doadora de elétrons) e o cátion divalente Ca²⁺ (Oaks & Hirel, 1985). Nesse experimento, o NO₃⁻ foi fornecido na forma de Ca(NO₃)₂. Portanto, a falta de Ca²⁺ não seria um limitador da atividade de GDH.

Magalhães & Huber (1989) relataram que a eficiência de assimilação de N pode ser relacionada a genótipos que tenham alta capacidade de incorporar o íon amônio em aminoácidos através das enzimas de assimilação (via GS/GOGAT e GDH). Em consideração a esse fato, nesse experimento, a cultivar IAC-25 e as variedades locais Goiano, Zebu Branco, Agulha e Comum Banco mostraram ser genótipos eficientes na assimilação de N.

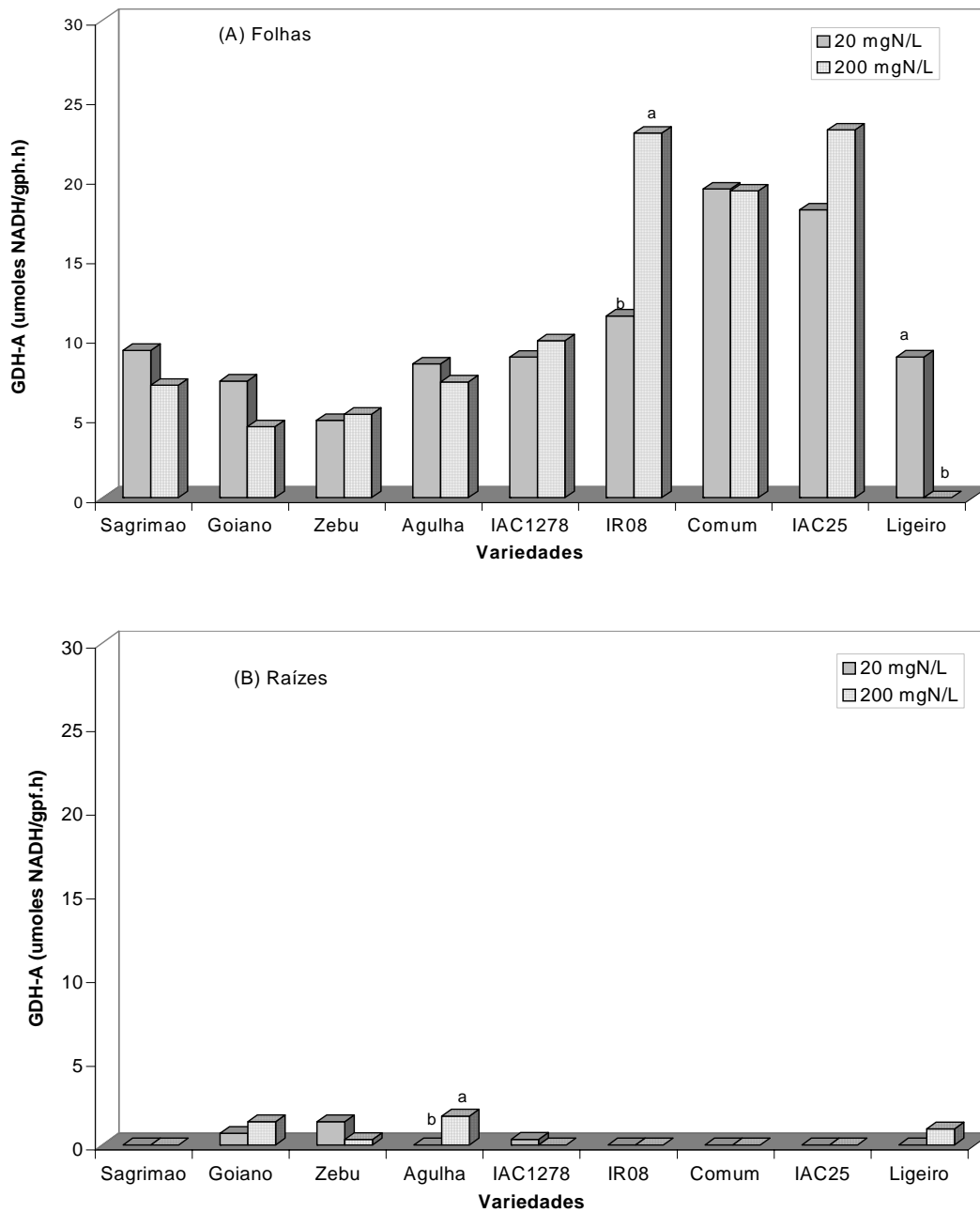


Figura 22. Atividade de GDH-Aminação em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (62 dias após a emergência).

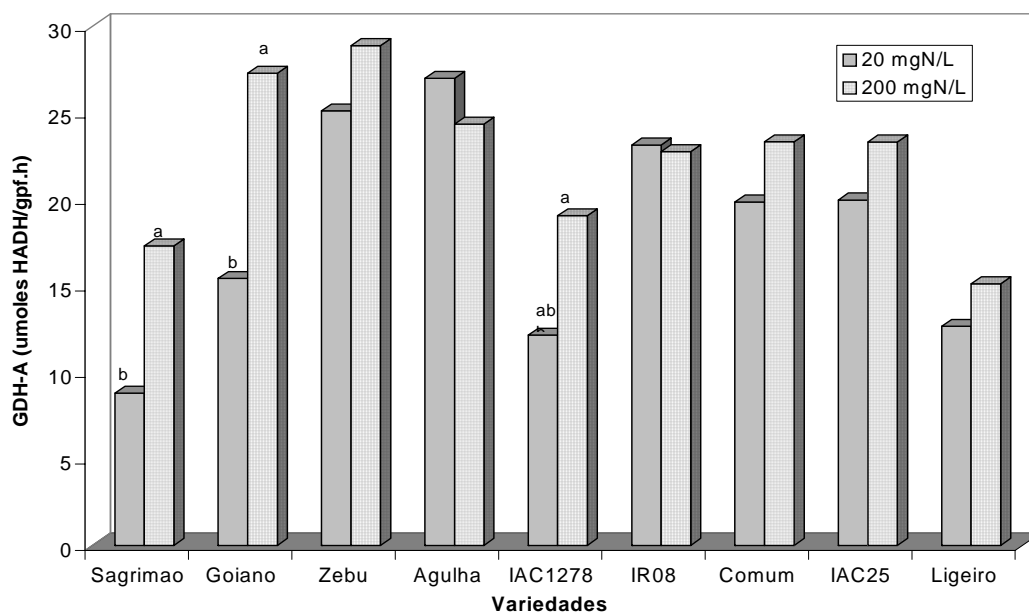


Figura 23. Atividade de GDH-Aminação em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (69 dias após a emergência).

4.6.13 Atividade de GDH-D

Observa-se na Figura 24 que só ocorreu atividade de GDH-D nas raízes das variedades Sagrimão, Goiano, Zebu Branco, Agulha e IAC 1278 em ambos tratamentos, e nas raízes da variedade Ligeiro, somente no tratamento de 200 mg N/L.

Analisando a atividade foliar de GDH-D, observa-se que as variedades Sagrimão e Goiano não apresentaram atividade, nem na primeira e nem na segunda coleta (Figura 24), as demais variedades apresentaram atividade de GDH-D. Na segunda coleta (Figura 25), observa-se que houve um aumento significativo da atividade de GDH-D na variedade Comum Branco, independente do nível de NO₃⁻ na solução. O efeito da concentração de NO₃⁻ sob a atividade de GDH-D foi significativo (p=0,05).

Não foi possível mensurar a atividade de GDH-Deaminação em tecidos radiculares das amostras da segunda coleta (nove dias após o fornecimento de N do tratamento de 200 mgN-NO₃⁻/L ter sido cortado), pois o espectrofotômetro apresentou defeito, exatamente no momento que as leituras seriam feitas, e apesar de terem sido efetuadas, as mesmas não apresentaram coerência entre os resultados das repetições, portanto esses dados foram dados como perdidos.

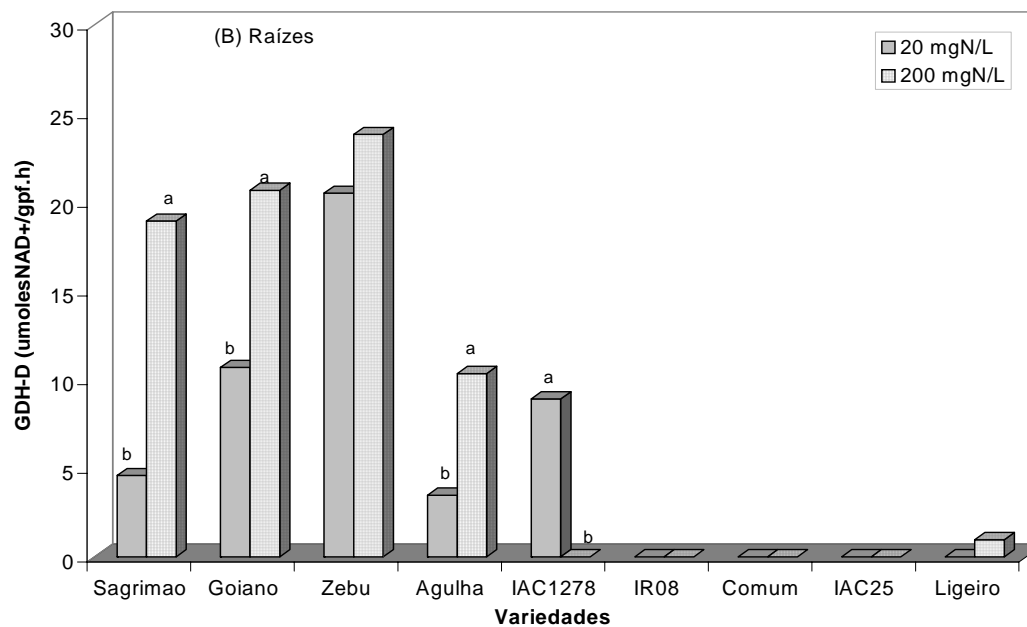
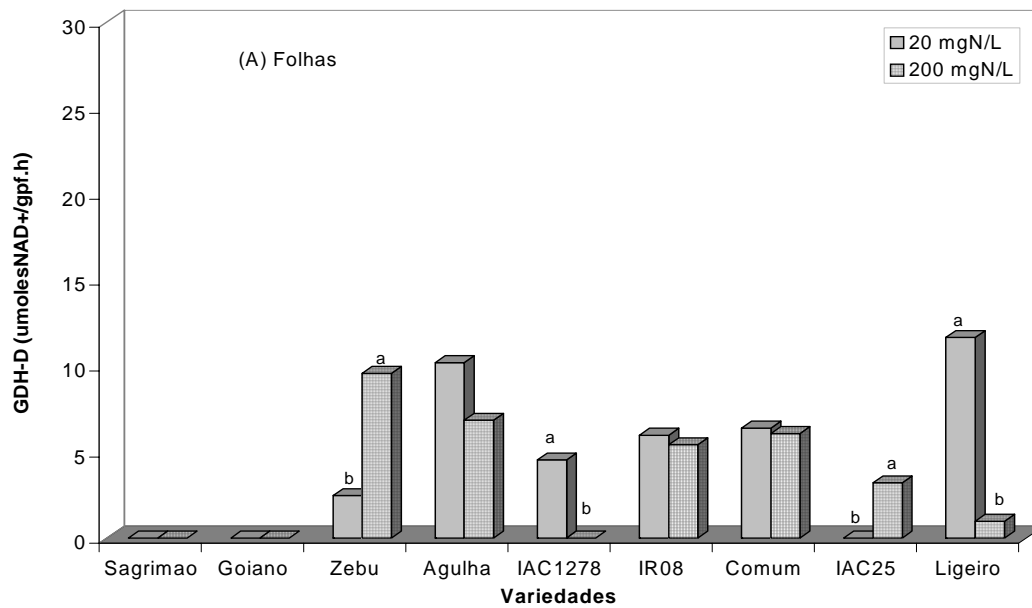


Figura 24. Atividade de GDH-Deaminação em (A) folhas e (B) raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (62 dias após a emergência)

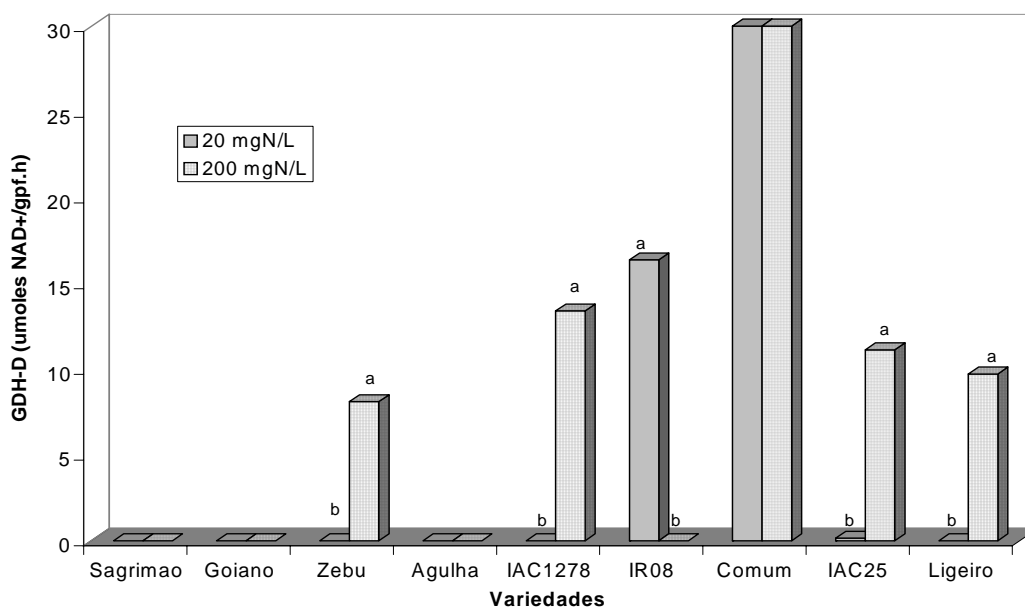


Figura 25. Atividade de GDH-Deaminação em (A) folhas de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L (69 dias após a emergência)

Foram observadas correlações negativas entre a atividade de GDH-D e as concentrações de NH₄⁺ de aminoácidos nas raízes (Tabelas 4 e 5).

A indução da atividade de GDH-D está relacionada à baixa disponibilidade de esqueletos de carbonos (senescência) ou quando este fator é limitante para o processo de assimilação de NH₄⁺ (toxidez de amônio). Em caso de toxidez de NH₄⁺, a eficiência do mecanismo de detoxicação, que envolve a produção de amidas, é fundamental para reduzir o efeito deletério de NH₄⁺ nas células (FERNANDES & ROSSIELLO, 1995).

Infelizmente, não se tem conhecimento do grau de tolerante à níveis de NH₄⁺ nos tecidos das variedades estudadas, entretanto possivelmente, no caso de Comum Branco, principalmente, a atividade de GDH-D seja um indicativo de toxidez NH₄⁺ nos tecidos.

Lennigher et al. (2000) relatam que a atividade de GDH-D está relacionada também a síntese protéica. Como os dois sistemas de Transporte de NO₃⁻ (LATS e HATS) podem ser induzidos pela concentração de NO₃⁻ na solução, a atividade de GDH-D, observada nesse experimento, poderia estar envolvida na síntese de novo de proteínas transportadores de NO₃⁻, principalmente as do tonoplasto. Essa síntese *de novo* estaria sendo regulada pela presença de NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺ e aminoácidos na célula, originados dos processos de absorção e redução de NO₃⁻ e assimilação de NH₄⁺.

No futuro, pesquisas devem ser conduzidas para caracterizar melhor o papel da atividade de GDH-D nessas variedades, que pode vir a constituir um mecanismo usado como estratégia a toxidez de NH₄⁺ em ambiente em que haja excesso temporário de NO₃⁻ (fluxo sazonal de NO₃⁻ em regiões tropicais). E até como característica de genótipos eficiente na absorção de NO₃⁻, se for confirmado a ação dessa enzima na síntese de novo de proteínas transportadoras de N em plantas.

Tabela 4. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita dois dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L.

20mgN/L								
	NO ₃ F	NO ₃ R	NH ₄ F	NH ₄ R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO ₃ F		0,03	-0,02	-0,25	-0,17	-0,15	-0,45	0,78
NO ₃ R	0,03		0,04	-0,26	0,03	-0,20	0,03	0,05
NH ₄ F	-0,02	0,04	1,00	-0,29	-0,19	-0,01	0,01	-0,07
NH ₄ R	-0,25	-0,26	-0,29	1,00	0,18	0,78	-0,15	-0,07
Amino F	-0,17	0,03	-0,19	0,18	1,00	0,10	0,84	-0,66
Amino R	-0,15	-0,20	-0,01	0,78	0,10	1,00	-0,07	0,02
Açúcar F	-0,45	0,03	0,01	-0,15	0,84	-0,07	1,00	-0,83
Açúcar R	-0,45	0,05	-0,07	-0,07	-0,66	0,02	-0,83	1,00
NR F	0,26		-0,41		0,68		0,21	
NR R		0,27		-0,21		-0,26		-0,40
GS F	0,25		0,51		-0,74		0,07	
GS R		0,07		0,27		0,17		-0,43
GOGAT F	-0,51		0,03		0,04		-0,08	
GOGAT R		0,39		-0,63		-0,79		-0,43
GDH-a F	0,33		-0,53		0,38		-0,07	
GDH-a R		0,05		-0,29		-0,64		-0,35
GDH-d F	0,06		0,19		-0,68		-0,48	
GDH-d R		0,09		-0,36		-0,64		-0,50
200 mgN/								
	NO ₃ F	NO ₃ R	NH ₄ F	NH ₄ R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO ₃ F		0,29	-0,37	0,26	-0,36	0,26	-0,13	0,43
NO ₃ R	0,29		0,00	0,64	0,55	0,75	0,18	0,21
NH ₄ F	-0,37	0,00	1,00	-0,34	0,50	-0,15	0,33	-0,76
NH ₄ R	0,26	0,64	-0,34	1,00	0,39	0,87	-0,08	0,57
Amino F	-0,36	0,55	0,50	0,39	1,00	0,53	0,46	-0,25
Amino R	0,26	0,75	-0,15	0,87	0,53	1,00	0,10	0,33
Açúcar F	-0,13	0,18	0,33	-0,08	0,46	0,10	1,00	-0,38
Açúcar R	-0,13	0,21	-0,76	0,57	-0,25	0,33	-0,38	1,00
NR F	-0,14		0,22		0,25		0,60	
NR R		-0,47		-0,04		-0,44		0,27
GS F	0,58		-0,77		0,13		0,74	
GS R		0,20		-0,06		0,00		-0,23
GOGAT F	0,06		0,12		0,65		0,29	
GOGAT R		-0,59		-0,66		-0,44		-0,83
GDH-a F	-0,05		-0,29		0,40		-0,19	
GDH-a R		0,19		-0,24		-0,21		-0,10
GDH-d F	-0,11		-0,01		0,20		-0,03	
GDH-d R		-0,52		-0,82		-0,81		-0,11

Tabela 5. Coeficientes de Correlação entre as variáveis determinadas em folhas e raízes de variedades de arroz submetidas a dois níveis de N na solução nutritiva (20 e 200 mg N/L), em coleta feita nove dias após ter sido retirado o N do tratamento que recebeu 200 mgN-NO₃⁻/L.

20mgN/L								
	NO ₃ F	NO ₃ R	NH ₄ F	NH ₄ R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO ₃ F		0,72	0,59	-0,24	0,29	0,29	0,76	-0,22
NO ₃ R	0,72		0,71	0,11	0,59	0,55	0,38	-0,11
NH ₄ F	0,59	0,71	1,00	0,41	0,64	0,57	0,64	0,29
NH ₄ R	-0,24	0,11	0,41	1,00	0,51	0,48	0,08	0,56
Amino F	0,29	0,59	0,64	0,51	1,00	0,99	0,28	0,35
Amino R	0,29	0,55	0,57	0,48	0,99	1,00	0,29	0,36
Açúcar F	0,76	0,38	0,64	0,08	0,28	0,29	1,00	0,37
Açúcar R	0,76	-0,11	0,29	0,56	0,35	0,36	0,37	1,00
NR F	0,11		0,68		0,85		0,17	
NR R		-0,01		0,14		0,51		0,02
GS F	0,00		0,18		0,09		0,54	
GS R		-0,13		0,39		0,19		0,25
GOGAT F	-0,62		-0,85		-0,68		-0,62	
GOGAT R		-0,44		-0,06		-0,72		-0,05
GDH-a F	0,14		-0,11		0,15		0,46	
GDH-a R								
GDH-d F	0,12		0,50		0,05		0,63	
GDH-d R		-0,09		0,14		0,56		0,08
200 mgN/L								
	NO ₃ F	NO ₃ R	NH ₄ F	NH ₄ R	Amino F	Amino R	Açúcar F	Açúcar R
NO ₃ F		-0,19	-0,12	-0,29	0,02	0,15	0,73	-0,44
NO ₃ R	-0,19		-0,61	0,21	-0,05	-0,55	-0,23	-0,05
NH ₄ F	-0,12	-0,61	1,00	0,47	0,61	0,69	-0,08	-0,35
NH ₄ R	-0,29	0,21	0,47	1,00	0,56	0,10	-0,64	-0,64
Amino F	0,02	-0,05	0,61	0,56	1,00	0,74	-0,13	-0,42
Amino R	0,15	-0,55	0,69	0,10	0,74	1,00	0,18	-0,13
Açúcar F	0,73	-0,23	-0,08	-0,64	-0,13	0,18	1,00	-0,07
Açúcar R	0,73	-0,05	-0,35	-0,64	-0,42	-0,13	-0,07	1,00
NR F	-0,23		0,85		0,35		0,04	
NR R		0,26		-0,01		-0,53		-0,16
GS F	0,27		-0,31		0,37		0,53	
GS R		0,56		0,07		-0,18		-0,28
GOGAT F	-0,49		-0,58		-0,38		-0,54	
GOGAT R		0,11		0,19		-0,48		0,23
GDH-a F	-0,12		-0,35		0,09		0,11	
GDH-a R								
GDH-d F	0,54		0,59		0,40		0,37	
GDH-d R		0,21		-0,19		-0,37		0,42

4.7 CONCLUSÕES

Neste experimento, a redução de NO_3^- , em arroz ocorreu preferencialmente nas raízes, apesar desse processo ocorrer tanto em folhas como em raízes. A capacidade de reduzir e assimilar nitrogênio em folhas e em raízes, pode representar vantagem do ponto de vista ecofisiológico.

É provável que o LATS de absorção NO_3^- tenha sido predominante no período do influxo sazonal de nitrato.

A regulação da atividade de NR foi afetada pelos teores de amino-N nos tecidos.

A atividade de GDH parece está envolvida na síntese *de novo* de proteínas de N em plantas.

Nas condições desse experimento, a cultivar IAC-25 e as variedades locais Goiano, Zebu Branco, Agulha e Comum Banco mostraram serem eficientes na assimilação de N.

Os resultados sugerem um comportamento diferencial na eficiência dos processos de redução de NO_3^- e assimilação de NH_4^+ detectado nas variedades em função da variabilidade genética existente entre elas detectada no capítulo 1.

A menor atividade da NR observada nas folhas das variedades locais (Sagrimão, Goiano, Zebu e Agulha) nesta fase do crescimento pode ser um fator positivo no acúmulo de N nos grãos.

5. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho revelou que a diversidade genética entre as *variedades locais* de arroz cultivadas no Estado do Maranhão é elevada, com coeficientes de similaridades que variaram até 75%. Essa diversidade mostra a habilidade dos agricultores em integrar e cultivar variedades responsíveis ao ambiente de cultivo, visando produtividades médias sustentáveis a sua sobrevivência, reflexo do manejo agrícola polivarietal, que contribui para a manutenção da diversidade e de variabilidade genética.

O método de análise de agrupamento mostrou-se eficiente para diferenciar as 16 variedades de arroz analisadas pela técnica de RAPD, revelando a formação de três grandes grupos: O primeiro até 30% de similaridade genética; o segundo entre 40% a 50%, e o terceiro acima de 50%.

Este estudo mostrou, ainda, capacidade diferencial de absorção e assimilação de N-NH_4^+ e N-NO_3^- pelas variedades de arroz estudadas, revelando diferenças significativas quanto à extrusão de prótons, à atividade das enzimas de assimilação de N, à partição de N na planta.

Conclui-se, com segurança, que esses parâmetros fisiológicos podem ser usados como marcadores moleculares bioquímicos para a seleção de variedades eficientes na absorção e utilização de N em plantas de arroz. Entretanto, faz-se necessário, estudos futuros para identificação de marcadores RAPD ligados a esses genes para a identificação ou desenvolvimento de novas variedades/cultivares de arroz eficientes na absorção e uso de N.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAGAARD, J.E.; KRUTOVSKII, K. V.; STRAUSS, S. H. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. **Heredity**, v. 81, p. 69-78. 1998.
- AHN, S.; BOLLICH, C. N.; TANKLEY, S. D. RFLP tagging of a gene for aroma in rice. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p.825-828.1992
- AHN, S.; ANDERSON, J. A.; SORRELLS, M. E.; TANKLEY, S. D. Homeologous relationships of rice, wheat and maize chromosomes. **Mol. Gen. Genet.** , v.241, p.483-490. 1993.
- AHN, S.; TANKLEY, S. D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.90, p.7980-7984. 1993.
- ALFENAS A.C. **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins**. UFV –Viçosa MG, 1998, 574p.
- AKAGI, H.; YOKOZEKI, Y.; INAGAKI, A.; FUJIMURA, T. Origin and evolution of twin microsatellites in the genus *Oryza*. **Heredity**, v. 81, p.187-197. 1998.
- AKKAYA, M.S.; BHAGWAT, A.A.; CREGAN, P.B. Length polymorfism of simple sequence repeat DNA in soybean. **Genetics**, v.132, p. 1131-1139. 1992.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R. L.; RAINS, D.W. Differential effect of amino acids nitrate uptake and reduction systems in bsrley in roots. **Plant Science**, v. 60, p. 219-228. 2001.
- ASLAM, M., TRAVIS, R. L., RAINS, D.W., HUFFAKER, R. C. Differential effect of ammonium on the induction of nitrate and nitrite reductase activities in roots of barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. **Physiol. Plant**, v.101, p. 612–619. 1997.
- ASLAM, M. & OAKS, A. Comparative studies on the induction and inactivation of nitrate reductase in corn roots and leaves. **Plant Physiology**, v. 57, p.572-576. 1976.
- ASSMANN, S. M. From proton to proteome. Twent-five years of research on ion transport in higher plant. **Plant Physiology**, v.125, p.139-141. 2001.
- BAPTISTA, J. A. **Cinética de Absorção de NH₄⁺ e fluxo de prótons e partição de N em arroz**. 1995. 107 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Agronomia,UFRRJ, Rio de Janeiro, 1995.
- BAPTISTA, J. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Cinética de absorção de amônio e crescimento radicular nas variedades de arroz Agulha e Bico Ganga. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 7, p.1325-1330. 2000.
- BERED, F., BARBOSA NETO, J. F., CARVALHO, F. I. F. de, Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.3, p. 513-520.1997.
- BLOOM, A. J., SUKRAPANNA, S. S., WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, v. 99, p.1294-1301. 1992.
- BOTSEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. V. Construction of a genetic linkage map in man using restrinction fragment length polymorphysms. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 32, p. 314-331,1980.
- BOUDRY, P.; WIEBER, R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; PILLEN, K.; Van DIJK, H.; JUNG, C. Identification of RFLP markers closed linked to the bolting gene *B* and their

- significance for study of the annual in beets (*Beta vulgaris L.*). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.88, p.852-858, 1994.
- CALÇADO Jr., F. L.; ESTANISLAU, M. L. L. Impactos da globalização no setor agropecuário. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 20, n.199, p. 20-28. 1999.
- CATOLDO, D. A.; HARRON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communication in soil science and plant analysis**, v.6, p. 853-855. 1975.
- CEREZO, M.; FLORS, V. LEGAZ, F. GARCIA-AGUSTÍN, P. Characterization of the low affinity transport system for NO₃- uptake by *Citrus* roots. **Plant Science**, v.160, p. 95-104. 2000.
- CHAGUÉ, V., MERCIER, J. C., GUÉNARD, M., de COURCEL, A., VEDEL, F. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to Sw-e in tomato by bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 92, p.1045-1051. 1996.
- CHEN, L. F. O; KUO, H. Y.; CHEN, M. H.; LAIK, K. N.; CHEN, S. C. G. Reproducibility of the differential amplification between leaf and root DNAs in soybean revealed by RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.1033-1043.1997.
- CHENG, C. L.; DEWDNEY, J.; KLEINHOF, A.; GOODMAN, H. M. Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. **Proc. Natl. Acad. Sci**, USA, v.83, p.6825-6828.1986.
- CHRISPEELS, M. J., CRAWFORD, N. M., SCHROEDER, J. I. proteins for transport of water and mineral nutrients across the membranes of plant cells. **The Plant Cell**, V. 11,p. 661-675. 1999.
- CLAASSEN, N.; BARBER, S. A. A method for characterizing the relation between nutrient and concentration and flux into roots of intact plant. **Plant Physiology**, Rockville, v.54, p.564-568. 1974.
- CLARKSON, D.T.; HAWKESFORD, M.J. Molecular biological approaches to plant nutrition. – From genetic engineering to field practice, p.23-33. 1993.
- CLEVELAND, D. A.; SOLERI, D.; SMITH, S.E. Do folk crop varieties have a role in sustainable agriculture? **BioScience**, v. 44, n.11, p.740-751, 1994.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; BAHIA, A. F. C. & GUEDES, G. A. A. Atividade de nitrogênio (¹⁵ N) em um latossolo vermelho-escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Brasília, v.15, p.187-193. 1991.
- COLOMBO, C., SECOND, G., VALLE, T. L., CHARRIER, A. Genetic diversity characterization of cassava cultivars (*Manihot esculenta* Crantz) RAPD Markers. **Genetics and Molecular Biology**, v.21, n.1, p.105-113. 1998.
- CORUZZI, G.; BUSH, D. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, p.61-64. 2001.
- DELOURME, R., BOUCHEREAU, A, HUBERT, N., RENARD, M. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic sterility of rapeseed (*Brassica napus L.*) **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p. 741-748. 1994.
- DELÚ-FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; ALVES, J. D.; PURCINO, A. C. Redução de nitrato e assimilação de amônio em plantas jovens de *Hevea brasiliensis* cultivada sob níveis crescentes de nitrato. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.3, p.185–190, 1998.

- DEVOS, K. M., GALE, M. D. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p.567-572. 1992.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v.26, p. 297-302. 1945.
- DODDEMA, H.; TELKAMP, G. P. Uptake of nitrate by mutants of *Arabidopsis thaliana*, disturbed in uptake or reduction of nitrate.II. Kinetics. **Phystologia Plantarum**, v.45,p.332-338. 1979.
- DUARTE, J. M., SANTOS, J. B., MELO, L.C. Comparison similarity coefficients based on RAPS markers in the common bean. **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, n. 3, p. 427-432. 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivares de arroz recomendadas para plantio no ano agrícola**. 1997/1998. 1997. 39p. (EMBRAPA/CNPAF. Informativo Anual das Comissões Técnicas Regionais de Arroz, n.5)
- EPSTEIN, E. **Nutrição mineral de plantas: Princípios e perspectivas**. Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1975, 433p.
- ESQUIBET, M., BEKAL, S., CASTAGNONE-SERENO, P., GAUTHIER, J. P., RIVOAL, R., CAUBEL, G. Differentiation of normal and giant *Vicia faba* populations of the stem nematode *Ditynchus dipsaci*: agreement between RAPD and phenotypic characteristics. **Heredity**, Edinburgh, v. 81, p. 291-298. 1998.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts. **Anal. Chem**, v. 49, p.1080. 1977.
- FENG, J.; VOLK, R. J.; JACKSON, W. A. Source and magnitude of ammonium generation in maize roots. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, p.835-841. 1998.
- FERNANDES, M. S. Effects of light and temperature on the nitrogen metabolism of tropical rice. Tese de doutorado. USA. Michingan State University, 1974.
- FERNANDES, M. S. **Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas**. Boletim Técnico N° 1, Instituto de Agronomia, UFRRJ, Rio de Janeiro, 1978. 50p.
- FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P. Mineral nitrogen inplant physiology and plant nutrition. **Critical Reviews in Plant Sciece**, v.14, n.2, p.111-148. 1995.
- FERNANDES, M. S.; ROSSIELLO, R. O. P.; ARRUDA, M. L. R. Relações entre capacidade de troca de cátions de raízes e toxidez de alumínio em duas gramíneas forrageiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, n.5, p. 631-637. 1984.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares RADP e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p.
- FERRAZ JR., A. S. L.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S; ROSSIELLO, R. O. P. Eficiência do uso de nitrogênio para produção de grão e proteína por cultivares de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.32, n.4, p.435-442. 1997.
- FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE, F. Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *arabidopsis thaliana* by differential display. **Planta**, v. 207, P. 461-469. 1999.
- FINDEHEGG, G. R. A comparative study of ammonium toxicity at different constant ph of the nutrient solution. **Plant Soil**, v. 103, p. 239-243. 1987.
- FONSECA, J. R.; RANGEL, P. H.; BEDENDO, I. P.; SILVEIRA, P. M. da; GUIMARÃES, E. P.; CORANDIN, L. **Características botânicas e agronômicas de**

cultivares e variedades regionais de arroz (*Oryza sativa* L.) coletadas no Estado do Maranhão. Goiânia: Embrapa-CNPAC-Cernagen, 1982. 42p. (Boletim de Pesquisa, 1).

FORDE, B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochim Biophys Acta**, p. 1465: 219–235. 2000.

FRAISIER, V.; GOJON, A.; TILLARD, P.; DANIEL-VEDELE, F. Constitutive expression of a putative high-affinity nitrate transporter in *Nicotiana plumbaginifolia*: evidence for post-transcriptional regulation by a reduced nitrogen source. **Plant Journal**, v. 23, p. 489–496. 2000.

FRIEDRICH, I. W.; SCHRADER, L. E. Sulfur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedling. **Plant Physiology**, Rockville, v. 61, p. 900-907. 1978.

FUKUI K., LIJIMA K. Somatic chromosome map of rice by imaging methods. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.81, p. 589–596. 1991.

FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P.R. **Composição e pH de soluções nutritivas para estudos fisiológicos e seleção de plantas em condições nutricionais adversas.** Boletim Técnico nº121, São Paulo, Campinas-IAC, 1988.

GARCIA, E., JAMILINA, M., ALVAREZ, J. I., ARNEDO, T., OLIVER, J. L. & LOZANO, R. Genetic relationships among melon breeding lines revealed by RAPD markers and agronomic traits. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, p. 878-885. 1998.

GAZZARRINI S, LEJAY L, GOJON A, NINNEMANN O, FROMMER WB, vonWIRE' N N. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation- induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**, v.11, p.937–947. 1999.

GRATTAPAGLIA, D., SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping and RAPD markers. **Genetics**, Chapel Hill, v. 137, p.1121-1137. 1994.

GROSSMAN, A., TAKAHASHI, H. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and fabric of interactions. **Annual Review of Plant Physiology**, Rockville, v.52; p.211 –231. 2001.

GUIMARÃES, E. P., BORRERO, J., OSPINA-REY, Y. Genetic diversity of upland rice germplasm distributed in Latin America. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n. 3, p.187-194. 1996.

GUIMARÃES, C. M.; YOKOYAMA, L.P.; BRESEGHELLO, F. **Sistemas de produção de Arroz de terras altas. In: Produção de Arroz de Sequeiro no Brasil.** Guimarães, C.M.(Coord). EMBRAPA/EMPAER, 2000. p. 181-201.

HILARIO, E., GOGARTEN, J. P. The prokaryote-to-eukriote transition reflected in the evolution of the V/F/A-ATPase catalytic and proteolipid subunits. **Journal Molecular Evolution**, v.46, n.6, p.703-15. 1998.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLEET, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, D.; GOUY, A. CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. Rockville, **Physiology**, v.125, p. 1258-1270. 2001. Hinrichsen e colaboradores (1996).

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Calif. Agric. Exp. Stn. Circ.**, v. 347, p.1–39. 1950.

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

- HU, J.; QUIROS, C. F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. **Plant Cell Rep.**, v.10, p.505-511. 1991.
- HUANG, N. C.; CHIANG, C. S.; CRAWFORD, N. M.; TSAY, Y. F. *CHL1* encodes a component of the low-affinity nitrate uptake system in *Arabidopsis* and shows cell type-specific expression in roots. **Plant Cell**, v.8, p. 2183–2191. 1996.
- IBGE, FUNDAÇÃO INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento Sistemática da Produção Agrícola de Arroz de sequeiro:GO, MA, MT, PA, PI e RO.** Rio de Janeiro. 1997.
- IBGE, FUNDAÇÃO INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola. Pesquisa mensal de revisão e acompanhamento de safras agrícolas do ano civil.** Rio de Janeiro, Outubro, 1999.
- ISHIYAMA, K.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to supply of ammonium ions. **Planta**, 204: 288-294. 1998.
- JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des alpes et des Jura. **Bull. Soc. Vaudoise Science Nature**, v.26, p. 297-302. 1901.
- JACKSON, A. A., SOMERS, K. M. AND HARVEY, H. H. Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence? *Am. Nat.* v.133, p.436-453, 1989. JAWORKI, E. G. Nitrate Reductase Assay in intact Plant Tissues. **Biochemical Biophysical Research Communications**. v.43, n.6, p.1274-1279. 1971.
- JACKSON, A. A., SOMERS, K. M. AND HARVEY, H. H. Similarity coefficients: measures for co-occurrence and association or simply measures of occurrence? **Am. Nat.** v.133, p.436-453. 1989.
- JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, London, v.316, p.76-79, 1985.
- JOHNS, M. A., SKROCH, P. W., NIENHUIS, J., KINRICHSEN, P., BASCUR, G. AND MUÑOZ-SCHICK, C. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data. **Crop Science**. V..37, p.605-613. 1997.
- KING, B. J.; SIDDIQI, M. Y.; RUTH, T. J. Feedback regulation of nitrate influx in barley roots and ammonium. **Plant Physiology**, Rockville, v.102, p.1279-1286. 1993.
- KOKAEVA, Z.G.; BOBROVA, V. K.; PETROVA, T.V.; GOSTIMSKY, S. A.; TROITSKY, A. V. Genetic polymorphism of pea cultivars, lines, and mutants detected by RAPD analysis. **Russian Journal of Genetic**, v.34, n.6, p.632-637. 1998.
- KRAPP, A.; FRAISIER, V.; SCHEIBLE, W. R.; QUESADA, A.; GOJON, A. STITT, M.; CABOCHE, M.; DANIEL-VEDELE, F. Expression studies of *Nrt2;INp*, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. **Plant Journal**, v.14, p. 723–731. 1998.
- KRONZUCKER, H. J.; SCHJOERRING, J. K.; ERNER, Y.; KIRK, G. J. D.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Dynamic interactions between root NH_4^+ influx and long-distance N translocation in rice: insights into feedback processes. **Plant Cell Physiology**, v.39, p.1287-1293.1998.
- KURATA, N., MOORE, G., NAGAMURA, Y., FOOTE, T., YANO, M., MINOBE, Y., GALE, M. Conservation of genome structure between rice and wheat. **Bio/Technology**, v.12, p. 276-278. 1994.
- LANZA, L. L. B., SOUZA JR., C. L., OTTOBONI, L. M. M., VIEIRA, M. L. C. de SOUZA, A P. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross

- performance using RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.94, p.1023-1030, 1997.
- LEA, P. J.; ROBINSON, S. A. & STEWART, G. R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. **The Biochemistry of Plants**, v.16, p.121-159. 1990.
- LEE, R. B.; RUDGE, R. A. Effects of nitrogen deficiency on the absorption of nitrate and ammonium by barley plants. **Annals of Botany**, v.57, p. 471-486. 1986.
- LEHNIGER, A.L; NELSON, D.L; COX, M. M. **Principles of biochemistry with extended discussion of oxygen-binding proteins**. New York: Worth Publishers, 2000.
- LEJAY, L.; TILLARD, P.; DOMINGO OLIVE, F.; LEPETIT, M.; FILLEUR, S.; DANIEL-VEDELE F.; GOJON, A. Molecular and functional regulation of two NO₃ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. **Plant Journal**, v.18, p. 509–519. 1999.
- LEMONS, G. B.; DELLU-FILHO, N.; OLIVEIRA, L. E. M.; PURCINO, A. A. C. Atividade das enzimas de assimilação do nitrato em plantas jovens de seringueira cultivadas com diferentes relações de nitrato e amônio. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, Brasília, v.11, n.2, p.113-118. 1999.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p.388-396. 1989.
- LIU, K. M.; HUANG, C. Y.; TSAY, Y F. CHL1 is a dual affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. **Plant Cell**, v.11, p. 865–874. 1999.
- MACKILL, D. J. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. **Crop Science**, v. 35, p. 889-894. 1995.
- MACHADO, A. T.; SODEK, L. FERNANDES, M. F. N-partitioning, nitrate reductase and glutamine synthetase activities in two contrasting varieties of maize. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.2, p. 249-256. 2001.
- MÄCK, G. Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH₄⁺. **Planta**, v.196, p.231-238. 1995.
- MAGALHÃES, J. R., HUBER, D. N. Ammonium assimilation in different plant species as affected by nitrogen form and pH control. **Fertilizer Research**, v.21, n. 1, p. 1-6, 1989.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Academic Press, London, 1995. pp. 229–312.
- MARTINS, P. S. Biodiversity and agriculture: patterns of domestication of Brazilian native plant species. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 66, p.219-226, 1994.
- MATOH, T.; IDA, S.; TAKASHI, E. Isolation and characterization of NADH-Glutamate synthase from PEA (*Pisum sativum* L.). **Plant Cell Physiology**, v. 21, p. 1467-1474. 1980.
- McCLURE, P. R.; KOCHIAN, L. V.; SPANSWICK, R. M.; SHAFF, J. E. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. **Plant Physiologist**, Rockville, v.93, p.290-294. 1990
- MENDONÇA, M. L. S. **Estudos dos mecanismos de tolerância ao alumínio e sua variabilidade genotípica em arroz (*Oryza sativa* L.)**. 1991. 176 f. Dissertação

- (Mestrado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Agronomia, UFRRJ, Rio de Janeiro. 1991.
- MILACH, S. C. K. Marcadores de DNA: Aplicação no melhoramento de plantas. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, p. 14-17. 1998.
- MILACH, S. C. K.; RINES, H. W.; PHILLIPS, R. L. Molecular genetic mapping of dwarfing genes in oat. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 95, p. 783-790. 1997.
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. Amino acid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, V. 28, P. 299-329. 1977.
- MIKLAS, P. N., STAVELY, J. R., KELLY, J. D. Identification and potential use of a molecular markers for rust resistance gene block in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.85, p. 745-749. 1993.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymology**, v.55, p.335-350. 1997.
- NEI, M.; TAJIMA, F.; TATAENO, Y. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. **Journal Molecular Evolution**, v. 19, p. 153-170. 1983.
- NEI, M.; LI, W. H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. **Proc. Nat. Academy Sci USA**, v.76, p.5269-5273. 1979.
- NAIK, M. S.; SARDHAMBAL, K.V. PRAKASH, S. Non-enzymatic photochemical reduction of nitrate in rice seedlings. **Nature**, London, v.262, p.396-397. 1976.
- NELSON N, HARVEY W. R. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. **Physiology Rev.**, v.79, n.2, p.361-85. 1999.
- NYBOM, H; ROGSTAD, S. H.; SCHAAL, B. A. Genetic variation detectada by use of the “DNA fingerprints” probe in *Malus*, *Prunus*, and *Rubus* (Rosacea). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.79, p.153-156. 1990.
- OAKS, A.; HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. **Annual Rev. of Plant Phisyology and Molecular Biology**, v.36; p.345 –365, 1985.
- OCHIAI, A. Zoogeographic studies on the soleoid fishes found in Japan and its neighbouring regions. **Bull. Jpn. Soc. Science Fish**, v. 22, p. 526-530. 1957.
- PALMGREN, M.G. Plant plasma membrane H⁺-ATP ases: powerhouses for nutrientes uptake. **Annual Ver. Plant Physiology and Molecular Biology**, v.52, p. 817-845. 2001.
- PARAN, I.; MICHELMORE, R. W. Development of reliable PCR-basead markers linked to downy mildew resistant genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 85, p. 985-993. 1993.
- PANAUD, O.; CHEN, X.; MACCOUCH, S. R. Development of microsatelite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). **Molecular Gene Genetics**, v. 252, p. 597-607. 1996.
- PATE, T.S. Transport and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review of Plant Physiology**, v.31, p.313-340. 1980.
- PATERSON, A H. TANKSLEY, S. D., SORRELLS, M. E. DNA markers in plant improvement. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 46, pp. 39-90. 1991.
- PEREIRA-NETO, A. B.; MAGALHÃES, A. C. M.; PINTO, H. S. Atividade da redutase de nitrato em Kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*): Padronização das condições de ensaio. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Brasília , v.1, n.2, p.133-137. 1989.

- PERONI, NIVALDO, MARTINS, PAULO SODERO AND ANDO, AKIHIKO Diversidade inter- e intra-específica e uso de análise multivariada para morfologia da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): um estudo de caso. **Scientia Agricola**, jul, v.56, n.3, p.587-595. 1999.
- PURCINO, A.A.C.; SANTOS, F.G., R.; SANTOS, M.X.; PAIVA, E., ROCHA, M.R. Atividade da redutase do nitrato em genótipos antigos e modernos de milho, cultivados sob dois níveis de nitrogênio. **R. Bras. Fisio. Vegetal**, v.6, n.1, p.41-46. 1994.
- QUESADA, A.; KRAPP, A.; TRUEMAN; L.J.; DANIEL-VEDELE, F.; FERNANDEZ, E.; FORDE, B.G.; CABOCHE, M. PCR-identification of a *Nicotiana plumbaginifolia* cDNA homologous to the high-affinity nitrate transporters of the crnA family. **Plant Molecular Biology**, v.34, p. 265–274. 1997.
- QUEROL, D. **Recursos genéticos, nosso tesouro esquecido: abordagem técnica e sócio-econômica**. Trd. Joselita Wasniewski. Rio de Janeiro: AS-PTA, 1993.206 p.
- ROBINSON, S.A.; SLADE, A.P.; FOX, G.G.; PHILLIPS, R.; RATCLIFFE, R.G.; STEWART, G.R. The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, p.509-516. 1991.
- ROGERS, D.J.; TANIMOTO, T.T. A computer program for classifying plants. **Science**, v. 132, p. 1115-1118, 1960.
- ROHLF, F.J. Consensus indices for comparing classifications. **Math. Bioscience**, v.59, p.131-144. 1982.
- RUIZ, H.A. Estimativa dos parâmetros cinéticos em K_M e $V_{máx}$ por uma aproximação gráfico-matemática. **Revista Ceres**, v.32, p.79-84. 1985.
- RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. CINÉTICA. Software para estimar as constantes $V_{máx}$ e K_M da equação de Michaelis-Menten. **XX Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas**. Anais. Piracicapa - SP, 1992, p.124-125.
- RUSSEL, P.F.; RAO, T.R. On habitat and association of species anopheline larvae in south-eastern Madras. **Journal Malaria Inst. India**, v.3, p. 153-178. 1940.
- SANO, T., SMITH, C. L., CANTOR, C.R. Deoxyribonucleic acids as unique markers in molecular detection. **Genetics analysis: Biomolecular Engineering**. v.14, p.37-40, 1997.
- SASAKI, T. The rice genome project in Japan. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 95, p.2027-2028, 1998.
- SILVA, G.C. da. Agrupamento de genótipos segundo a adaptabilidade ao ambiente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília. v.30, n.9, p. 1141-1154, set. 1995.
- SILVA, E., F.; MOLTALVÁN, R.; ANDO, A. Genealogia dos cultivares brasileiros de arroz-de-sequeiro. **Bragantia**. Campinas. V.58, n.2, p. 281-286.1999.
- SIVASANKAR, S.; ROTHSTEIN, S.; OAKS, A. Regulation of the accumulation and reduction of nitrate by nitrogen and carbon metabolites in maize seedlings, **Plant Physiology**, Rockville, v.114, p.583–589. 1997.
- SKROCH, P., NIENHUIS, J. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetics distance. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.91, p.1086-1091. 1995.
- SKROCH, P.; TIVANG, J.; NIENHUNS, J. Analysis of genetic relationship using RAPD marked data. **Journal Am. Hort. Science**, v. 105, p. 26-30. 1992.
- SMITH, J.S.C.; SMITH, O. S. Associations among inbred lines of maize using electrophoresis, chromatographic and pedigree data. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.76, p.39-44.1988.

- SMITH, F.A.; RAVEN, J.A. Intracellular pH and its regulation. **Annual Rev. Plant Physiology**. V.30, p.289-311. 1979.
- SOKAL, R.R.; MICHENER, C.D. A statistical method for evaluating systematic relationships. **Science Bull**, v.38, p. 1409-1438. 1958.
- 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 (Doutorado em Agronomia), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – Agronomia, UFRRJ, Rio de Janeiro. 1995.
- SOUZA, S.R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two brasilian rice varietie. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, n.10, p. 2049-2063. 1998.
- STITT, M. Nitrate regulation of metabolim and growth. **Curr. Opin. Plant Biology**, v.2, p.178-186. 1999.
- SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. **Phytochemistry**, 19:725-733.1980.
- TEDESCO, M.J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de planta por digestão por H₂O₂-H₂SO₄. UFRGS, 1982. 23p.
- TEIXEIRA JR., A. R. Globalização e a pesquisa agropecuária. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.20, n.199, p. 62-68. 1999.
- TEIXEIRA, S.M.; SANINT, L.R. O arroz no Brasil In: Arroz de sequeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.14, n.161, p.5-9, 1999.
- TINGEY, S. V.; del TUFO, J. P. Genetic Analysis with random amplification polymorphic DNA markers. **Plant Phisiology**, Rockville, v.101, p.349-352. 1993.
- TRAORE, A., MARANVILLE, J.W. Nitrate reductase activity of diverse grain sorghum genotypes and its relationship to use efficiency. **Agronomy Journal**, v. 91, p. 863-869. 1999.
- TREEP, G.P.; PLANK, O.W.; GANTT, J. S.; VANCE, C. P. NADH-Glutamate Syntetase in Alfafa root nodukes. Immunocytochemical Localization. **Plant Physiology**, Rockville, v.119, p. 829-837. 1999.
- VANDERMEER, J. The ecological basis of alternative agriculture. **Annual Rev. Ecol. Syst.**, v. 26, n. 201, p.201-224. 1995.
- VIDMAR, J.J, ZHUO, D., SIDDIQI, M.Y., GLASS, A.D.M. Isolation and characterization of *HvNRT2.3* and *HvNRT2.4*, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. **Plant Physiology**, Rockville, v.122, p. 783–792. 2000.
- VIDMAR, J.J.; ZHUO, D.; SIDDIQI, M.Y.; SCHJOERRING, J.K.; TOURAINE, B.; GLASS, A.M.D. Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley, **Plant Physiology**, Rockville, V.123 : p.307–318. 2000a.
- VIERLING, R. A, NGUYEN, H. T. Use of RAPD to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.84, p.835-838. 1992.
- VILARINHOS, A. D; BARROS, E. G.; PAIVA, E.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A. Use of the roandom amplified polymoorphic DNA téchnique to characterize soybean (*Glycine max* L. Merrill) genotypes. **Revista Brasileira de Genética**, Brasília, v. 17, n.3, p. 287-290. 1994.

- VIRK, P.S.;NEWBURY, H. J.; JACKSON, M. T.; FORD-Lloyd, B. V. The identification of duplicate accessions within a rice germplasm collection using RAPD analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 90, p.1049-1055, 1995.
- VIRK, P. S., FORD-LLOYD, B. V., JACKSON, M. T., POONI, H. S., CLEMENO, T. P., NEWBURY, H.J. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. **Heredity**, v.79, p. 296-304. 1996.
- VIRK, P. S., FORD-LLOYD, B. V., NEWBURY, H.J. Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion. **Heredity**, v.81, p. 613-620. 1998.
- von WIRÈN N.; LAUTER, F.R.; NINNEMANN, O.; GILLISSEN, B.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; JOST, W.; FROMMER W.B. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. **Plant Journal**, 21: 167–175. 2000.
- von WIRÈN, N.N., GAZZARRINI, S., GOJON, A.; FROMMER, W.B. The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. **Curr Opin Plant Biology**, v.3, p.254–261. 2000a
- ZHANG, Q., LIU, K. D., YANG, G. P., SAGHAI MAROOF, M. A, XU, C. G., ZHOU, Z. Q. Molecular marker diversity and hybrid sterility in indica-japonica rice crosses. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.95, p.112-118.1997.
- ZHANG, Q., SAGHAI MAROOF, M. A, LU, T. Y., SHEN, B. Z. Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83, p.495-499,1992.
- ZHU, J., GALE, M. D., QUARRIE, S. JACKSON, M. T., BRYAN, G. J. AFLP markers for the study of rice biodiversity. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.96, p.602-611,1998.
- ZHUO, D.; OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A.D.M. Regulation of putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2; 1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**. V.17, p. 563–569. 1999.
- YAMAYA, T.; TANNO, H.; HIROSE, N., WATANABLE, S; HAYAKAWA, T. A supply of nitrogen causes increase in level of NADH-dependent glutamate synthase protein and activity of enzyme in roots of rice seedlings. **Plant Cell Physiology**, v.36, n.7, p.1197-1204. 1995.
- YANG, X., QUIROS, C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.86,p.205-212. 1993.
- YEMM, E. W.; COCKING E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. **Analyst**, v. 80, p.209-213. 1955.
- YEMM, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **Biochemistry**, v. 57, p. 508-514. 1954.
- YI, Q. M; DENG, W. G.; XIA, Z. P.; PANG, H. H. Polymorphism and genetic relatedness among wild and cultivated rice species determined by Ap-PCR analysis. **Hereditas**, v. 122, p.135-141. 1995.
- WALLSGROV, R.M.; KEYS, A.J.; LEA, P.J. & MIFLIN, B.J. Photosynthesis, photorespiration and nitrogen metabolism. **Plant Cell and Environment**, v.6, p.301-309. 1983.
- WALLSGROVE, R. M.; TURNER, J. C.; HALL, N. P.; KENDALLY, A. C.; BRIGHT, S. W. J. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase- biochemical and genetic analysis. **Plant Physiology**, v.83, p.155-158. 1987.

- WANG, Z. Y., SECOND, G., TANKSLEY, S. D. Polymorfism and phylogenetic relationships among species in the *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.83,p.565-581, 1992.
- WANG, M. Y., SIDDIQI, M. Y., RUTH, T. J., GLASS, A. D. M. Ammonium uptake by rice roots: II. Kinetics of 13 NH_4 influx across the plasmalemma. **Plant Physiology**, Rockville, v.103, p.1259–1267.1993.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary iniciadors. **Nucleic Acids Res.**, 18: 7213-7218, 1990.
- WILLIAMS, J. G.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, L. A.; TINGLEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary marckers. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, p. 6531-6535. 1990.
- WILLIAM, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Reviews Pant Phisiology and Molecular Biology**, p.659-688. 2001.
- WILSON, G. H.; GROLIG, F.; KOSEGARTEN, H. Differential pH restoration after ammonia-elicited vacuolar alkalisation in rice and maize root hairs as measured by luorescence ratio. **Planta**, 206: 154-161. 1998.
- WU, K.S.; TANKLEY, S.D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatelites in rice. **Molecular Gene Genetics**, v. 241, p. 225-235. 1993.

7. ANEXOS

7.1 ANEXO I

7.1.1 Preparo de Soluções Utilizadas nos Protocolos.

a) 1.0 M Tris-Hcl pH 8.0

- Pesar 12 g de Tris;
- Dissolver em 60 ml de água destilada;
- Ajustar o pH para 8.0 usando HCl concentrado;
- Completar o volume para 100 ml com água destilada.
- Estocar a 4°C (em geladeira).

b) Brometo de etídeo [4ug/ul]

- Brometo de etídeo pesar 40 mg
- Completar o volume para 10 ml de água
- Armazenar em frasco âmbar envolto em papel alumínio
- Utilizar 3,7 ul em cada 100 ml de gel.

c) Tampão TBE 10x (Tris, Ác. Bórico, EDTA)

Usado na Cuba de Eletroforese e preparação de géis.

- Pesar 54 g de Tris- base
- Pesar 27,5 g de ácido Bórico
- 40 ml de EDTA 0,25 M a pH 8.0
- dissolver os reagentes em água destilada e esterilizada e completar o volume para 500 ml.
- Autoclavar
- Validade: Indeterminada

d) Solução de TBE 1X

- 200 ml de TBE 10X
- Completar com 1800 ml de água destilada
- Homogeneizar bem.
- Essa solução quando usada no tanque de eletroforese pode ser reaproveitada até três vezes.

e) Tampão de extração 2x CTAB

- pesar 2,0 g CTAB, concentração final 2%
 - pesar 8,12 g NaCl, concentração final 1,4 M
 - diluir em 4 ml de um estoque de 0.5 M [20 mM EDTA]
 - adicionar 10 ml de um estoque de 1 M [100 mM Tris-Cl pH 8.0]
 - pesar 1 g Polivinipirrolidone, concentração final 1%
 - Completar o volume a 100 ml com H₂O esterilizada
 - adicionar 2-Mercaptoetanol, concentração final 0.2% (2 µl /ml de tampão)
- OBS: CTAB – Alquiltrimetil brometo de amônio

f) 10% SDS

- pesar 10 g de SDS;
- Dissolver em água destilada;
- Completar o volume para 100 ml com água destilada;
- Estocar a temperatura ambiente.

g) Gel de Agarose 1,2%

- Pesar 3,00 g de agarose
- Adicionar 25 ml de TBE 10X e mais 225 ml de água (diluir para TBE 1X)
- Aqueça em microondas por 3 minutos
- Verta na cuba, encaixe o pente e deixe polimerizar por 30 minutos

h) Gel de Agarose 0,9%

- Pesar 2,25 de agarose
- Adicionar 25 ml de TBE 10X e mais 225 ml de água (diluir para TBE 1X)
- Aqueça em microondas por 3 minutos
- Quando o gel atingir 60°C adicione o brometo de etídeo
- Verta na cuba, encaixe o pente e deixe polimerizar por 30 minutos

i) Acrilamida

- Pesar 29.2 g de acrilamida;
- Pesar 0.8 g de bis-acrilamida
- Dissolver em 100 ml de água destilada.
- Estocar a solução a 4°C
- Validade: 1 mês.

7.2 ANEXO II

7.2.1 Coeficientes de Similaridades Obtidos Para as 17 Variedades de Arroz:

a) Simple Matching (SM)

$$\frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Lageado	1.000
Bico Gan	0.637 1.000
Zebu Bra	0.725 0.736 1.000
Lg. Verm	0.692 0.681 0.791 1.000
Goiano	0.648 0.593 0.681 0.648 1.000
Comum B	0.450 0.681 0.549 0.626 0.582 1.000
Dobradin	0.604 0.747 0.615 0.626 0.582 0.670 1.000
A. Reven	0.538 0.681 0.615 0.560 0.648 0.604 0.670 1.000
Cana Rox	0.406 0.549 0.527 0.582 0.582 0.626 0.582 0.626 1.000
Ligeiro	0.560 0.681 0.571 0.604 0.604 0.560 0.648 0.626 0.648 1.000
Sagrimão	0.527 0.648 0.648 0.615 0.637 0.571 0.637 0.659 0.703 0.813 1.000
Agulha	0.582 0.637 0.659 0.648 0.604 0.516 0.604 0.626 0.670 0.692 0.791 1.000
IAC - 47	0.538 0.615 0.615 0.670 0.604 0.560 0.648 0.604 0.670 0.736 0.791 0.824 1.000
IAC - 25	0.494 0.659 0.615 0.648 0.560 0.582 0.626 0.582 0.670 0.692 0.769 0.714 0.824 1.000
IAC - 127	0.637 0.626 0.626 0.637 0.593 0.461 0.659 0.571 0.549 0.747 0.714 0.747 0.703 0.703 1.000
IR - 08	0.560 0.615 0.593 0.582 0.648 0.516 0.648 0.538 0.604 0.692 0.747 0.736 0.736 0.736 0.769 1.000

b) coeficiente de Nei e LI (dice)

$$\frac{2a}{2a+b+c}$$

Lageado	1.000
Bico Ganga	0.294 1.000
Zebu Branco	0.667 0.333 1.000
Lg. Vermelho	0.533 0.356 0.596 1.000
Goiano	0.311 0.178 0.383 0.429 1.000
Comum Branco	0.271 0.508 0.328 0.514 0.457 1.000
Dobradinho	0.298 0.511 0.286 0.414 0.345 0.583 1.000
A. Revenda	0.275 0.431 0.340 0.355 0.484 0.526 0.531 1.000
Cana Roxa	0.299 0.388 0.377 0.513 0.513 0.630 0.525 0.595 1.000
Ligeiro	0.163 0.408 0.235 0.400 0.400 0.459 0.484 0.485 0.610 1.000
Sagrimão	0.200 0.360 0.385 0.426 0.459 0.480 0.476 0.537 0.675 0.738 1.000
Agulha	0.275 0.353 0.415 0.484 0.419 0.421 0.438 0.500 0.643 0.576 0.716 1.000
IAC - 47	0.255 0.364 0.386 0.545 0.455 0.500 0.529 0.500 0.659 0.657 0.732 0.778 1.000
IAC - 25	0.255 0.436 0.386 0.515 0.394 0.525 0.500 0.472 0.659 0.600 0.704 0.639 0.789 1.000
IAC - 1278	0.167 0.292 0.320 0.441 0.373 0.329 0.492 0.400 0.494 0.635 0.594 0.646 0.609 0.609 1.000
IR - 08	0.151 0.340 0.327 0.406 0.500 0.436 0.515 0.400 0.581 0.588 0.667 0.657 0.676 0.676 0.687 1.000

c) Coeficiente de Jaccard (J)

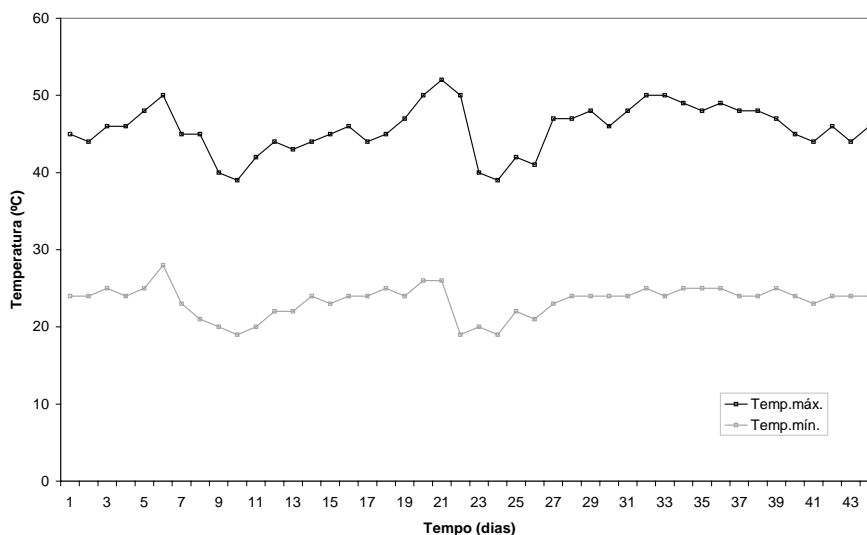
$$\frac{a}{a+b+c}$$

Lageado	1.000
Bico Ganga	0.172 1.000
Zebu Branco	0.500 0.200 1.000
Lg. Vermelho	0.364 0.216 0.424 1.000
Goiano	0.184 0.098 0.237 0.273 1.000
Comum Branco	0.157 0.341 0.196 0.346 0.296 1.000
Dobradinho	0.175 0.343 0.167 0.261 0.208 0.412 1.000
A. Revenda	0.159 0.275 0.205 0.216 0.319 0.357 0.362 1.000
Cana Roxa	0.175 0.241 0.232 0.345 0.345 0.460 0.356 0.424 1.000
Ligeiro	0.089 0.256 0.133 0.250 0.250 0.298 0.319 0.320 0.439 1.000
Sagrimão	0.111 0.220 0.238 0.271 0.298 0.316 0.313 0.367 0.509 0.585 1.000
Agulha	0.159 0.214 0.262 0.319 0.265 0.267 0.280 0.333 0.474 0.404 0.558 1.000
IAC - 47	0.146 0.222 0.239 0.375 0.294 0.333 0.360 0.333 0.492 0.489 0.578 0.636 1.000
IAC - 25	0.146 0.279 0.239 0.347 0.245 0.356 0.333 0.309 0.492 0.429 0.543 0.469 0.652 1.000
IAC - 1278	0.091 0.171 0.190 0.283 0.229 0.197 0.326 0.250 0.328 0.465 0.422 0.477 0.438 0.438 1.000
IR - 08	0.082 0.205 0.196 0.255 0.333 0.279 0.347 0.250 0.410 0.417 0.500 0.489 0.510 0.510 0.523 1.000

7.3 ANEXO III

7.3.1 Médias de Temperaturas Máximas e Mínimas Medidas Durante a Condução dos Experimentos

a) Experimento de cinética de absorção.



b) Experimento de fluxo sazonal de nitrato.

