



## Acúmulo de N-total e aminoácidos livres em plantas de arroz silenciando a isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase OsA2<sup>(1)</sup>.

**Hellen Fernanda Oliveira da Silva<sup>(2)</sup>; Danilo Silva Pinto<sup>(3)</sup>; Marcus Vinícius Loss Sperandio<sup>(4)</sup>; Leandro Azevedo Santos<sup>(5)</sup>; Manlio Silvestre Fernandes<sup>(6)</sup>; Sonia Regina de Souza<sup>(7)</sup>.**

<sup>(1)</sup> Trabalho executado com recursos do CPGA-CS, CAPES, CNPQ

<sup>(2)</sup> Estudante de graduação em Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica, RJ; hellenfosa@gmail.com; <sup>(3)</sup> Estudante de graduação em Agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; <sup>(4)</sup> Doutorando no curso de Pós-Graduação em Agronomia/Ciência do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; E-mail: marcusloss@gmail.com; <sup>(5)</sup> Professor Adjunto II do Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; E-mail: azevedo@ufrj.br; <sup>(6)</sup> Professor Emérito do Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; E-mail: manlio@ufrj.br; <sup>(7)</sup> Professora Associada II do Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; E-mail: soniabq@ufrj.br.

**RESUMO:** Uma alternativa para diminuir as perdas de N do solo é o uso de plantas que possuem maior capacidade de absorção. Os componentes-chaves para tal capacidade são a H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática (PM H<sup>+</sup>-ATPase) e os transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O objetivo do presente trabalho é analisar a importância das isoformas específicas de PM H<sup>+</sup>-ATPase OsA2 no acúmulo de N-total e aminoácidos livres (N-amino livre) usando os mutantes de arroz *amiRNA-osa2*. Foram usados três linhagens mutantes silenciando a isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase OsA2 (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*), além de plantas transformadas com o vetor IRS154 vazio como controle. Os tratamentos foram: sem N, 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> constante e 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> constante. O acúmulo de N-amino livre foi menor somente nas plantas mutantes *amiRNA-osa2* cultivadas com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> constante, enquanto nos outros tratamentos não houve diferença nos teores de N-amino livre. O teor de N-total nas plantas mutantes *amiRNA-osa2* também foi reduzido no tratamento com 0,2 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> constante. O decréscimo dos teores de N-amino livre e N-total com baixa dose de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> indicam menor absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nessas condições. Os resultados indicam a importância da isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase OsA2 em plantas cultivadas com baixa dose de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

**Termos de indexação:** bomba de próton, nitrato, frações nitrogenadas.

**INTRODUÇÃO:** O nitrogênio (N) é o nutriente mineral que mais limita a produção de arroz, sendo exigido também para o melhoramento da qualidade nutricional do grão de arroz, Mingotte et al. (2012). Desse modo, o entendimento da dinâmica do N no cultivo de arroz é de extrema importância para obter boas produtividades e diminuir as perdas de N.

O arroz aproveita de forma eficiente o NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, enquanto outras espécies não suportam o NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como única fonte de N. O N mineral aplicado apresenta utilização de apenas 30%, enquanto o restante é perdido por lixiviação, volatilização e desnitrificação. Uma alternativa para diminuir a perda de N do solo são plantas que possuem maior capacidade de absorção. Os componentes-chaves para a maior absorção de N são a H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática (PM H<sup>+</sup>-ATPase) e os transportadores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ambos os componentes sofrem indução de acordo com a dose de N aplicada e sofrem regulação por feedback provocado pela redução do N.

Uma importante ferramenta para estudos da importância dos componentes da absorção de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> é o uso de plantas silenciando genes alvo, através da tecnologia do micro RNA interferente (*amiRNA*). Essa técnica diminui a expressão do gene alvo e possibilita melhor entendimento da função de cada gene.

O objetivo do presente trabalho é analisar a importância da isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase OsA2 usando plantas de arroz mutantes silenciando a isoforma OsA2 no acúmulo de aminoácidos livres (N-amino livre) e N-total usando os mutantes de arroz *amiRNA-osa2* silenciando a isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase OsA2.

### MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo das plantas foi realizado em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 14h/10h (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de 250 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, umidade relativa do ar de 70% e temperatura 28°C/24°C (diurna/noturna). O experimento foi montado com delineamento inteiramente casualizado em um fatorial contendo as doses de N e fonte de N usando três repetições.

### Tratamentos e amostragens

Sementes de arroz dos mutantes *amiRNA-osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e plantas transformadas



com vetor vazio IRS como controle foram previamente desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio 2% por 10 minutos e depois lavadas várias vezes com água destilada. Em seguida foram transferidas para potes contendo somente água destilada onde uma gaze foi usada para impedir a imersão das sementes. Seis dias após a germinação (DAG), as plântulas foram transferidas para vasos com volume de 700 ml com quatro plantas por vaso, usando solução de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) modificada com  $\frac{1}{4}$  da força iônica total, onde um grupo recebeu 2 mM de  $N-NO_3^-$  como fonte de N e outro 0,2 mM de  $N-NO_3^-$ . O pH da solução foi ajustado para 5,5. Após três dias, as plantas receberam solução de Hoagland modificada com  $\frac{1}{2}$  força iônica, continuando um grupo com 2 mM de  $N-NO_3^-$  como fonte de N e outro 0,2 mM de  $N-NO_3^-$ . A partir de então, esta mesma solução foi reposta a cada três dias.

Quinze dias após a germinação, metade dos vasos com 2,0 mM de  $N-NO_3^-$  receberam solução de Hoagland modificada sem nitrogênio, enquanto o restante continuou recebendo a solução de Hoagland com 2 mM de  $N-NO_3^-$  ou 0,2 mM de  $N-NO_3^-$ . Assim, houve três tratamentos: um grupo permaneceu constantemente com 2,0 mM de  $N-NO_3^-$ , outro constantemente com 0,2 mM de  $N-NO_3^-$ , e outro com deficiência de  $NO_3^-$  por três dias.

Seis horas após a aplicação dos tratamentos, as plantas foram armazenadas em etanol 80%. Após a partição com clorofórmio, a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (Yemm & Cocking, 1955). O teor de N-total foi determinado por Tedesco et al. (1982).

#### Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância usando o software SISVAR (Ferreira, 2000). Para análise dos dados foi usada a análise de variância e aplicado o teste Tukey a 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As comparações de crescimento, acúmulo de N-amino livre e N-total foram feitas usando plantas IRS, que são plantas que passaram pelo processo de transformação, mas não contêm a construção para silenciamento gênico. As plantas mutantes *amiRNA-osa2* silenciando a isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase *Osa2* apresentaram menor acúmulo de N-amino livre (Figura 1) quando cultivadas com 0,2 mM de  $N-NO_3^-$  constante, enquanto nas plantas cultivadas com 2,0 mM de  $NO_3^-$  ou sem N por três dias não apresentaram diferenças quando comparadas com a planta controle IRS.

O teor de N-total também apresentou redução nos mutantes silenciando *Osa2* quando cultivadas com 0,2 mM de  $N-NO_3^-$  constante quando comparadas com as plantas controle IRS (Figura 2A).

Os resultados de N-amino livre e N-total indicam que as plantas mutantes *amiRNA-osa2* apresentaram redução da absorção de N somente quando cultivadas com baixa dose de  $NO_3^-$  (0,2 mM), indicando a importância da PM H<sup>+</sup>-ATPase na adaptação de plantas de arroz a condições com baixo suprimento de  $NO_3^-$ .

O cálculo do Índice de Eficiência de Absorção de N (iEAN) foi feito de acordo com Wang et al. (2015), usando a razão entre o teor de N-total das plantas cultivadas com baixa dose de N (0,2 mM) e alta dose (2,0 mM). O iEAN mostra que as plantas mutantes silenciando *Osa2* com apresentaram menor iEAN quando comparados com a planta controle IRS.

## CONCLUSÕES

A isoforma de PM H<sup>+</sup>-ATPase *Osa2* é essencial para a absorção de N em baixas doses de  $NO_3^-$ , evidenciado pelo menor acúmulo de N-amino livre e N-total nos mutantes silenciando *Osa2*. Esses resultados mostram que a PM H<sup>+</sup>-ATPase é um componente chave para a Eficiência de Absorção N em arroz.

## AGRADECIMENTOS

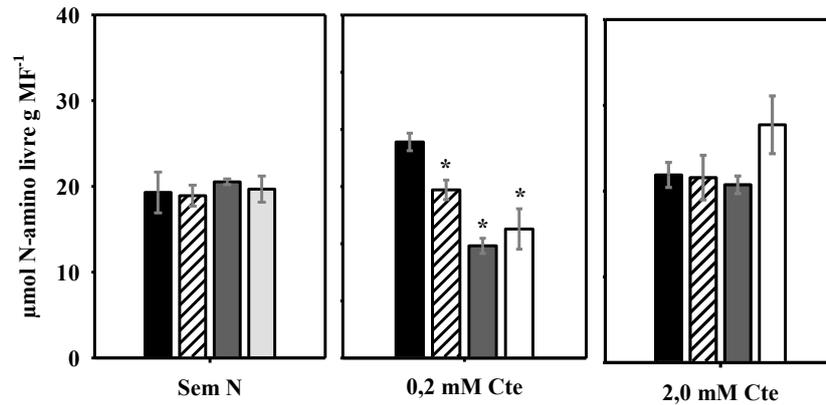
Ao Curso de Pós-graduação em Ciência do Solo da UFRRJ e ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo fomento.

## REFERÊNCIAS

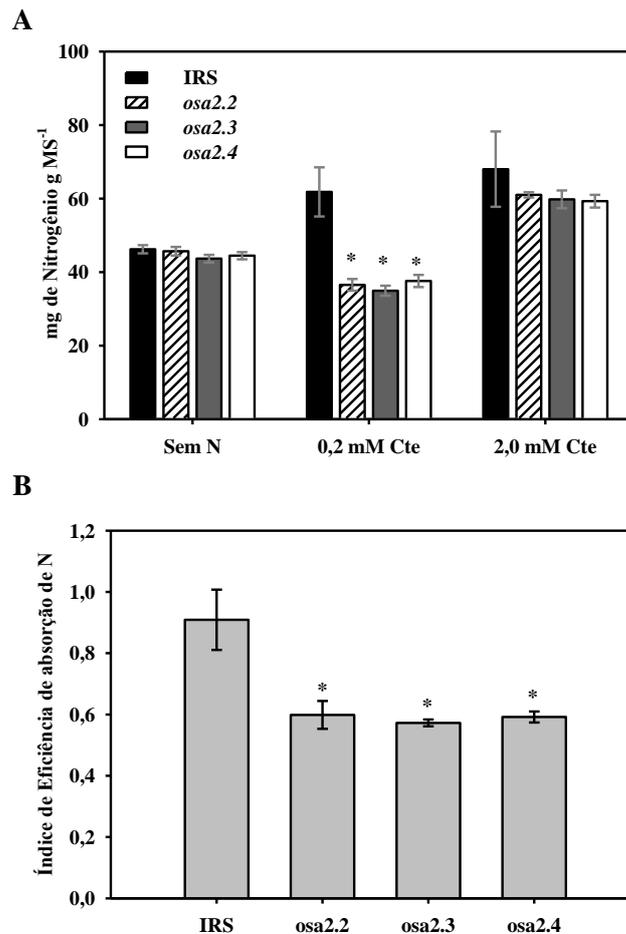
- FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. **Anais**. São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Stn. Bull.*, v.347, p.1-32, 1950.
- MINGOTTE, F. L. C.; HANASHIRO, R. K.; FORNASIERI FILHO, D. Características físico-químicas do grão de cultivares de arroz em função da adubação nitrogenada. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2605-2618, 2012.
- TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com  $H_2O_2-H_2SO_4$ . UFRGS. 1982. 23p.
- WANG, G. L.; DING, G. D.; XU, F. S.; CAI, H. M.; ZOU, J.; YE, X. S. Genotype differences in photosynthetic characteristics and nitrogen efficiency of new-type oilseed rape responding to low nitrogen stress. **Journal of Agricultural Science**, 2015 (in press).



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



**Figura 1.** Concentração de N-amino livre linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de  $N-NO_3^-$  constante, ressuprimento com 0,2 mM de  $N-NO_3^-$  e 2,0 mM de  $N-NO_3^-$  constante. \* indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ( $P < 0,05$ ).



**Figura 2.** (A) Teor de N-total nas linhagens mutantes *osa2* (*osa2.2*, *osa2.3* e *osa2.4*) e IRS (controle) cultivadas sem N, com 0,2 mM de  $N-NO_3^-$  constante e 2,0 mM de  $N-NO_3^-$  constante. (B) Índice de Eficiência de Absorção de N entre a planta controle IRS e os mutantes *osa2*, calculado a partir da relação entre o N-total das plantas cultivadas com 0,2 mM (baixa dose) e 2,0 mM de  $N-NO_3^-$  (alta dose). \* indica diferença entre as linhagens *osa2* em comparação com a planta controle (IRS) pelo teste F ( $P < 0,05$ ).