

Parâmetros cinéticos de absorção em plantas de arroz superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3*⁽¹⁾.

Sara Yumi Sassamoto Kurokawa⁽²⁾; Leandro Martins Ferreira⁽³⁾; Rafael Passos Rangel⁽⁴⁾; Sara Brasil de Carvalho⁽⁵⁾; Leandro Azevedo Santos⁽⁶⁾ & Sonia Regina de Souza⁽⁷⁾

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Faperj; ⁽²⁾ Graduanda do Curso de Engenharia Agrônoma, Instituto de Agronomia, Bolsista Faperj da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ, CEP: 23890-000, sara_kurokawa@hotmail.com; ⁽³⁾ Doutorando do Curso de Engenharia Agrônoma, Instituto de Agronomia, Bolsista Faperj da UFRRJ; ⁽⁴⁾ Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo – Bolsista Capes – UFRRJ; ⁽⁵⁾ Graduanda do Curso de Engenharia Agrônoma, Instituto de Agronomia, Bolsista Cnpq da UFRRJ; ⁽⁶⁾ Professor adjunto Departamento de Solos UFRRJ; ⁽⁷⁾ Professora Associada IV do Departamento de Química da UFRRJ.

RESUMO: As plantas, em geral, não tendem a acumular altas concentrações de amônio, por ser tóxico e precisar ser rapidamente incorporado a esqueleto de carbono. Dessa maneira, esse trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de absorção de amônio em plantas de arroz transformadas com o transportador de amônio *Oryza sativa ammonium transporter 1.3* (*OsAMT1.3*) em condição de baixa e alta disponibilidade de amônio. Analisando-se os parâmetros cinéticos envolvidos na absorção de NH_4^+ , observou-se que plantas WT apresentaram maior valor de massa fresca total, massa fresca da parte aérea e da raiz no tratamento de alta concentração (2,0 mM de NH_4^+). Em ambos os tratamentos, a L#8 demonstrou menor valor de K_M seguido da L#2 e WT. A curva de depleção de amônio no tratamento de baixa concentração demonstrou que a L#8 foi capaz de extinguir o amônio em menor tempo. Conclui-se que plantas superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* apresentam maior eficiência de absorção em condição de baixa disponibilidade de amônio.

Termos de indexação: *Oryza sativa*, alta afinidade (HATS), solução nutritiva

INTRODUÇÃO

O reduzido consumo de proteína "per capita" no país aliada a participação do arroz em grande proporção na dieta da população brasileira, principalmente a de baixa renda, justificam a procura por variedades de arroz com alto teor de proteína nos grãos e eficientes no uso de nitrogênio

Yao et al. (2008) verificaram que o *OsAMT1.3* é expresso exclusivamente em raízes durante os estágios de desenvolvimento da planta, sob condições de suprimento e deficiência de nitrogênio.

O *OsAMT1.3* é induzido pela redução drástica dos níveis de amônio, o que pode estar relacionado com a absorção de amônio quando a concentração

deste íon na solução do solo está muito baixa (Tabuchi et al. 2007).

A necessidade de estudos para a seleção de variedades com melhor mecanismo para a absorção de nitrogênio em solos sob baixas concentrações, é essencial para a sustentabilidade da agricultura mundial (Glass et al., 2002). Para isso, é necessário um profundo entendimento das respostas bioquímicas e moleculares de plantas submetidas a concentrações limitantes de nitrogênio e condições de estresse. Sugere-se que o *OsAMT1.3* pode funcionar como gene sinalizador da presença de N no solo, bem como transportador potencialmente envolvido na absorção de N-NH_4^+ sob níveis muito reduzidos no solo (Sonoda et al., 2003)

O objetivo do trabalho é identificar a contribuição do *OsAMT1.3* para o sistema de alta afinidade de absorção de amônio por meio da análise dos parâmetros cinéticos de absorção ($V_{\text{máx}}$ e K_M) nas linhagens transformadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A transformação de plantas de arroz é realizada baseada no protocolo de Toki et al. (2006) com modificações. Sementes de arroz foram colocadas para germinar em meio contendo 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para a produção de calos embriogênicos na região do escutelo da semente.

Apenas os calos friáveis foram selecionados e colocados em contato com *Agrobacterium tumefaciens*. Após um período de co-cultivo de três dias os calos foram lavados com timentim, antibiótico para eliminar a *Agrobacterium*. Logo em seguida esses calos foram colocados em meio contendo higromicina para seleção das células transformadas. Apenas os calos resistentes e com boa atividade de crescimento no meio de seleção são transferidos para o meio de regeneração, onde são obtidas as plantas transformadas.

Cada plântula regenerada no cultivo *in vitro* representou uma linhagem independente (L1, L2, L3 e assim por diante). As sementes das linhagens

transformadas L#2 e L#8 e tipo selvagem (WT) foram inicialmente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio (2%), lavadas com água destilada, acondicionada sobre gaze em potes de 1,7 L e colocadas para germinar em água destilada na câmara de crescimento do Departamento de Solos da UFRRJ. Cinco dias após a germinação, as plantas foram transferidas para potes de 700 mL e conduzidas em sistema hidropônico com solução de Hoagland & Arnon (1950) modificada a $\frac{1}{2}$ FI com 0,5 mM de N-NO_3^- .

Aos 27 dias após a germinação (DAG), as plantas foram submetidas a uma solução sem N por 72 horas e então divididas em dois grupos: onde o primeiro recebeu uma solução com 0,2 mM de N-NH_4^+ e o segundo 2,0 mM de N-NH_4^+ .

Para o parâmetro cinético, os níveis de N-NH_4^+ na solução foram monitorados em intervalos de 30 minutos para o tratamento de baixa concentração e em intervalos de 1 hora para o tratamento de alta concentração de N-NH_4^+ durante dois dias e então armazenadas em microtubos de 1,5 mL. O conteúdo de amônio foi determinado pelo método proposto por Felker (1977) e os valores de $V_{\text{máx}}$ e K_M pelo processo gráfico-matemático proposto por Ruiz & Fernandes Filho (1992).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No tratamento de 0,2 mM N-NH_4^+ , não houve grandes variações na biomassa total e parte aérea entre as linhagens transformadas e plantas não transformadas. Entretanto, quando sob alto suprimento de N, as plantas WT apresentaram maior biomassa em todas as partes analisadas. Apesar da menor biomassa das plantas transformadas no tratamento com maior dose de N-NH_4^+ , não houve alterações significativas na razão raiz:parte aérea (Tabela 1).

Com relação aos parâmetros cinéticos, para $V_{\text{máx}}$, as linhagens transformadas apresentam comportamento distinto comparado às plantas WT. A L#8 apresentou maior valor de $V_{\text{máx}}$ no tratamento com 0,2 mM de N-NH_4^+ e valores levemente menores no tratamento com maior dose de N-NH_4^+ . A L#2 apresentou $V_{\text{máx}}$ menor no tratamento com

0,2 mM de N-NH_4^+ , já no tratamento com 2,0 mM de N-NH_4^+ houve um aumento na velocidade de absorção. A $V_{\text{máx}}$ variou de 1,9-2,4 $\mu\text{mol.g}^{-1}\text{h}^{-1}$ e o K_M de 20-40 μM (Kronzucker et al., 1996). Este valor de K_M está de acordo com o encontrado neste trabalho, no entanto deve se levar em consideração que a espécie vegetal é diferente e o design experimental utilizado manteve as plantas privadas de N apenas por um período de três dias (Tabela 2). A curva de depleção no tratamento de 0,2 mM N-NH_4^+ demonstra que a absorção se deu de forma contínua do início ao final do experimento (Figura 1). As menores taxas de decréscimo na concentração de N-NH_4^+ em solução observados para a L#2 é reflexo da menor biomassa das plantas dessa linhagem (Tabela 2)

Para o tratamento de 2,0 mM N-NH_4^+ é observada uma queda inicial da concentração de N-NH_4^+ em solução nas primeiras 10h do ensaio, uma estabilização a partir de então até às 26h e novamente uma queda até o final do ensaio (Figura 2).

O pH da solução nutritiva foi monitorado a partir do momento em que foram aplicados os tratamentos.

As plantas absorvem o NH_4^+ em um processo dependente de energia. As bombas de prótons PM-H^+ -ATPases, hidrolisam o ATP bombeando H^+ para fora da célula, o que cria um ambiente eletrogênico no interior das células necessário para absorção de cátions via canal iônico e transportadores. À medida que a planta absorve o amônio, de forma passiva, a favor do seu gradiente de potencial eletroquímico, uma quantidade proporcional de prótons são expulsos pelas bombas de prótons para manutenção do equilíbrio de cargas, fazendo com que haja decréscimo do pH na solução nutritiva (Fernandes & Souza, 2006).

Dessa forma, espera-se que a queda no valor de pH seja proporcional ao influxo de N-NH_4^+ . De fato foi o que ocorreu, onde apenas uma leve queda de pH foi observado no tratamento com 0,2 mM de N-NH_4^+ , e quedas mais acentuadas no tratamento com 2,0 mM de N-NH_4^+ (Figura 3), acompanhando o mesmo comportamento da depleção de N-NH_4^+ (Figura 1 e Figura 2).

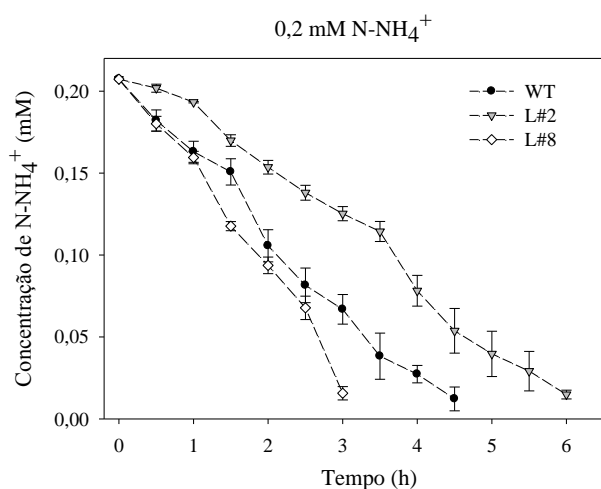


Figura 1. Depleção de $N-NH_4^+$ na solução nutritiva com o cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de $N-NH_4^+$ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

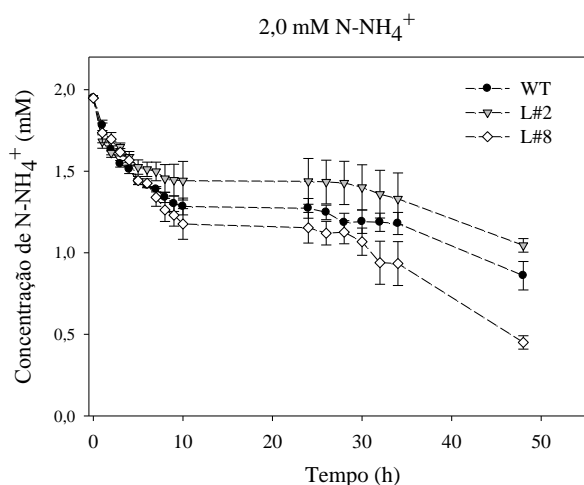


Figura 2. Depleção de $N-NH_4^+$ na solução nutritiva com o cultivo de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento com $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $N-NH_4^+$ após 72 horas de privação de N. Barras representam o desvio padrão das médias.

CONCLUSÕES

As linhagens transformadas apresentam menor massa fresca quando submetida a altas concentrações de amônio em solução, o que pode ser reflexo de uma maior taxa de absorção de amônio por essas plantas.

As linhagens transformadas apresentam menor valor de K_M quando sob baixo suprimento de

nitrogênio. Este parâmetro indica uma maior eficiência de absorção que pode ser reflexo da superexpressão do transportador de amônio *OsAMT1.3*.

AGRADECIMENTOS

À Faperj, CAPES e ao CPGA-CS pela concessão de bolsa para o desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, 1977.
- FERNANDES, M.S. & SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S., ed. Nutrição mineral de plantas. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p.115-152.
- GLASS A. D. M.; BRITTO, D. T.; KAISER, B. N. et al. The regulation of nitrate and ammonium transport system in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.53, p.855-864, 2002.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v.347, p.1-32, 1950.
- KRONZUCKER, H.J.; SIDDIQI, M.Y. & GLASS, A.D.M. Kinetics of NH_4^+ influx in spruce. **Plant physiology**. p.773-779, 1993.
- SONODA, Y.; IKEDA, A.; SAIKI, S. et al. J. Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (*OsAMT1;1-1;3*) in rice. **Plant Cell Physiology**, v.44, p.726-734, 2003.
- TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v.58, n.9, p.2319-2327, 2007.
- TOKI, S.; HARA, N.; ONO, K. et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. **The Plant Journal**, v.47, p.969-976, 2006.
- YAO, S.; SONODA, Y.; TSUTSUI, T. et al. Promoter analysis of *OsAMT1;2* and *1;3* implies their distinct roles in nitrogen utilization in rice. **Breeding Science**. v.58, p.201-207, 2008.

Tabela 1. Massa fresca (g planta^{-1}) e razão raiz: parte aérea (R/PA) de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 e 2,0 mmoles L^{-1}) após 72 horas de privação de N.

Tratamento	WT	L#2	L#8	WT	L#2	L#8
	Massa fresca total (g. planta^{-1})			Massa fresca Parte aérea (g. planta^{-1})		
0,2 mM	6,71a*	5,80a	7,45a	3,43a	3,10a	3,75a
2,0 mM	7,73a	5,08b	6,04ab	4,16a	2,67b	3,20ab
Tratamento	Massa fresca Raiz (g. planta^{-1})			Razão R/PA		
	WT	L#2	L#8	WT	L#2	L#8
0,2 mM	3,28a	2,71a	3,70a	0,95a	0,88a	1,00a
2,0 mM	3,57a	2,40b	2,83ab	0,86a	0,89a	0,88a

Tabela 2. Parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_M) da absorção de N-NH_4^+ de plantas de arroz da variedade Nipponbare superexpressando o transportador de amônio *OsAMT1.3* linhagens L#2 e L#8 e planta do tipo selvagem (WT), submetidas ao ressuprimento de N-NH_4^+ (0,2 e 2,0 mmoles L^{-1}) após 72 horas de privação de N.

Tratamento	WT	L#2	L#8	WT	L#2	L#8
	$V_{\text{máx}}$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$)			K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
0,2 mM	9,28ab*	7,68b	9,39a	24,52a	18,04ab	11,68b
2,0 mM	27,14ab	35,60a	20,17b	1385,11a	1397,45a	1063,05b

* Médias seguidas da mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.