



Caracterização fenotípica e Eficiência de Remobilização de N de mutantes de arroz *Osaap1* e *Osaap18*⁽¹⁾.

Erinaldo Gomes Pereira⁽²⁾; **Cassia Pereira Coelho**⁽³⁾; **Leandro Azevedo dos Santos**⁽⁴⁾; **Sônia Regina de Souza**⁽⁵⁾; **Manlio Silvestre Fernandes**⁽⁶⁾

⁽¹⁾Trabalho executado com recursos do CPGA-CS, CAPES, CNPQ.

⁽²⁾Estudante de graduação em agronomia; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Seropédica; RJ; erinaldominas@hotmail.com; ⁽³⁾ Estudante de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Ciência do Solo; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ; Seropédica, Rio de Janeiro; ⁽⁴⁾ Professor Adjunto II, Departamento de Solos; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ ⁽⁵⁾ ; Professora Associada IV, Departamento de Química; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ; ⁽⁶⁾ Professor Emérito; Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

RESUMO: Grande parte da Eficiência de Uso de Nitrogênio (EUN) é ligada à Eficiência de remobilização de N (ERN) dos cultivos no período reprodutivo da cultura, levando o estudo de genes que codificam para proteínas envolvidas na remobilização de N durante o período de enchimento dos grãos, em especial os transportadores de aminoácidos, que são a principal forma de remobilização de N orgânico nas plantas no período de enchimento de grãos, a ser de extrema relevância. Foi instalado um experimento em casa de vegetação para caracterização fenotípica e Eficiência de Remobilização de Nitrogênio (ERN) das plantas mutantes 3A-00581, mutante por T-DNA para o gene *OsAAP18* (LOC_Os06g36210), e 4A-00262, mutante por T-DNA para o gene *OsAAP1* (LOC_Os07g04180).

Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 2 linhagens mutantes (*Osaap1* e *Osaap18*) e uma tipo selvagem, com 4 repetições.

Ao final do ciclo foi realizada a caracterização fenotípica e a ERN das plantas cultivadas.

Os resultados obtidos sugerem a provável participação de *OsAAP18* no transporte de aminoácidos para os grãos em desenvolvimento, uma vez que plantas mutantes para esse gene apresentaram menor produção de grãos e remobilização de N para os grãos.

Não foi possível afirmar a participação de *OsAAP1* no processo de remobilização de N para os grãos em arroz com os dados observados, sendo necessárias mais análises.

Termos de indexação: EUN, transportadores, *Oryza sativa*.

INTRODUÇÃO

Em arroz há uma ausência de estudos sobre genes relacionados a remobilização de nitrogênio, tornando importante o estudo desses genes.

Em análises prévias foi verificado que o gene de arroz *Os06g36210* (*OsAAP18*) pode estar associado a funções de transporte de aminoácidos para os grãos em plantas de arroz durante o período reprodutivo. A caracterização fenotípica de plantas mutantes para esse gene (*Osaap18*) pode ajudar a entender os mecanismos envolvidos na remobilização de N na forma de aminoácidos em plantas de arroz e contribuir para futuros estudos visando o aumento da EUN por plantas e produção de grãos com maiores teores de proteína. Além disso, a determinação da ERN em plantas mutantes de arroz para os genes de transportadores de aminoácidos pode ajudar a desvendar a influência desses genes sobre a EUN.

O objetivo desse trabalho foi fazer a caracterização fenotípica de mutantes de arroz silenciando os genes *OsAAP18* (LOC_Os06g36210) e *OsAAP1* (LOC_Os07g04180) e determinar a ERN nesses mutantes de arroz.

MATERIAL E MÉTODOS

Plantas das linhagens 4A-00262, 3A-00581 e tipo silvestre foram germinadas em água em câmara de crescimento. Após germinação as plantas foram transferidas para potes (com capacidade de 700ml) com solução nutritiva de Hoagland & Arnon modificada contendo 2mM de N a ¼ de FI e após três dias para a solução na mesma concentração a ½ FI. As plantas permaneceram nos potes por quatro semanas para a realização do teste de higromicina para confirmar da mutação e separação das plantas a serem utilizadas no experimento. Após confirmação pelo teste de higromicina foram separadas plantas das linhagens mutantes e tipo silvestre para implantação do experimento.

As plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 10 litros contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon modificada com 2mM de 15N em excesso (1mM de nitrato e 1mM de amônio). As plantas permaneceram nessa solução até o período



da antese. O pH da solução foi corrigido a cada 3 dias e trocada a cada 7 dias.

Foi utilizado Sulfato de amônio com 15N em excesso (1% de excesso) para marcação para posterior análise de alocação de N nos tecidos das plantas. O enriquecimento com 15N foi mantido até a antese. Após a antese as plantas foram transferidas para solução de Hoagland & Arnon modificada com 0,2mM (0,1mM de nitrato e 0,1mM de amônio) sem marcação, onde permaneceram até o final do ciclo.

Caracterização fenotípica

Para a caracterização fenotípica das plantas mutantes e tipo silvestre foram analisados os seguintes parâmetros agrônômicos: produção de massa, comprimento do ciclo, época de florescimento, comprimento do colmo, comprimento da panícula, número de panículas por perfilho, número de espiguetas por panícula, taxa de enchimento de grãos (%), número de grãos cheios e chochos, peso total do grão (g) e peso de 100 grãos (g).

Análise de N total, 15N e determinação da ERN

Foi determinada a alocação de 15N em excesso nas diferentes partes das plantas na antese e final do ciclo e estes resultados foram utilizados como parâmetro para determinar a ERN.

Foram coletadas amostras de folhas, bainhas, panículas e raízes das plantas de arroz em duas coletas. Na antese, após a troca da solução de 2M de N contendo 15N em excesso pela solução de 0,2M de N sem marcação, e ao final do ciclo. As amostras de plantas retiradas na antese serviram de referência para o excesso de 15N na planta após a retirada da solução com marcação.

Foram estimadas a produtividade de colmos, folhas, panículas e raízes e a massa de massa seca total da parte aérea. Amostras das diferentes partes das plantas foram secadas em estufa de circulação forçada de ar a 65 C° até atingirem massa constante. As amostras foram inicialmente passadas em moinho tipo Wiley (2 mm) para, depois, serem finamente moídas em um sistema similar ao de Arnold & Schepers (2004). Em seguida, foram realizadas as determinações de N total segundo método semimicro-Kjeldahl (Nogueira & Souza, 2005). Após a análise do teor de N total nos tecidos foram determinados os pesos para análise de 15N.

Após a análise do teor de N total o total de 15N nas amostras das plantas foi determinado em espectrômetro de massas (Finnigan MAT, Bremen, Alemanha). A análise de 15N em excesso avaliada

na antese foi utilizada como padrão para comparação com os valores encontrados nas diferentes partes da planta no final do ciclo e cálculo do N remobilizado para os grãos.

Como o N mineral absorvido até a antese foi absorvido a partir de solução marcada com 15N a absorção acumulada e posterior translocação a partir de diferentes partes da planta foi calculada a partir do 15N em excesso em cada tecido. Consequentemente, o padrão de translocação líquida de N endógeno não marcado (14N não marcado absorvido antes do início de experimento) pode ser utilizado para calcular a remobilização de N dentro da planta.

O N nos grãos no final do ciclo e em folhas mais novas derivado da mobilização de N endógeno não marcado foi calculado por subtração do N total (14N + 15N) primeiramente do 15N derivado da absorção de NH₄⁺ marcado e posteriormente do conteúdo inicial de 14N encontrado nos tecidos antes da marcação.

Análise estatística

Os resultados das linhagens independentes foram analisados separadamente e comparados com suas respectivas plantas controle (wild type) por análise de variância utilizando o programa Assistat. Os efeitos das variáveis foram verificados pelo teste F (5% de probabilidade). Quando houve diferenças significativas reveladas pela ANOVA, as médias dos tratamentos foram separadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferenças no número de altura de perfilhos verificadas entre as plantas não influenciaram a produção de massa seca (Figura 1), uma vez que não foram verificadas diferenças significativas entre as linhagens e plantas tipo silvestre para esse parâmetro.

Tabela1 - Produção de massa fresca (M.F), panículas (Pan.), perfilhos (Perf.) e altura das plantas (A.P)

Parâmetros	WT	4A-00262	3A-00581
M.F (g/vaso)	188 a	161 a	159 a
A.P (cm)	54 ab	55 ab	35a
Pan.(un)	16a	14a	22ab
Perf.(un)	17a	15a	31ab

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de tukey ao nível de 5 % de probabilidade.



As plantas tipo selvagem apresentaram maior altura quando comparadas com as plantas mutantes 3A-00581, porém um menor número de perfilhos e de panículas (**Tabela 1**). Este maior número de perfilhos e panículas apresentado pelas plantas mutantes 3A-00581 não refletiu em maior produtividade, uma vez que apesar da grande produção em números totais de grãos dessas plantas cerca de 86% deste apresentaram-se chochos (**Figura 1**), indicando problemas no enchimento dos grãos, o que pode ser resultado de problemas no transporte de aminoácidos tanto no período de formação do endosperma quando no período de formação do embrião, o que nesse caso levaria à formação de grãos estéreis. O menor número de grãos das plantas 3A-00581 também foi acompanhado de menor produção em termos de massa de grãos (**Figura 2**).

A menor produção apresentada pelas plantas 3A00581 está de acordo com os resultados observados por Schmidt et al. (2007), que verificaram que linhagens *ataap8* apresentaram um menor tamanho total das silículas que plantas tipo silvestre e que o total de possíveis sementes (sementes contáveis + sementes abortadas) foi reduzido em cerca de 50%, sendo esse fenótipo visíveis nas duas diferentes linhagens mutantes utilizadas no experimento.

Não foram observadas modificações fenotípicas marcantes ou redução da produção para as plantas LOC_4A00581.

Os resultados evidenciam que o gene LOC_Os06g36210 está envolvido no processo de remobilização de N para os grãos e o seu silenciamento afeta a produtividade.

Não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros de % de N remobilizado na panícula, e residual no colmo e nas folhas (tabela 2).

Tabela 2 - Porcentagem de N remobilizado e de N presente no final do ciclo

Parâmetros	WT	Osaap1	Osaap18
N remobilizado (%)	79,96a	85,09a	85,25a
N residual C. (%)	73,76a	71,12a	70,14a
N residual F.V (%)	68,45a	72,75a	72,30a
N residual F.i (%)	80,27a	81,25a	73,69a

As médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o teste de tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Isso pode estar relacionado à quantidade de N aplicado em solução. O fornecimento de maiores teores de N podem influenciar na remobilização de

N para os grãos, reduzindo suas taxas. Como foram fornecidos 2 mM de N durante toda a fase vegetativa das plantas e posteriormente 0,2mM na fase reprodutiva isso pode ter afetado a remobilização. Devido à condições do experimento não é possível afirmar que a mutação de *Osaap1* e *Osaap18* não afetou a ERN, para isso, seria necessário repetir o experimento com doses menores de N.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem a provável participação de *Osaap18* no transporte de aminoácidos para os grãos em desenvolvimento, e que esse gene afeta a produção de grãos e a remobilização de N para os grãos.

Não foi possível afirmar a participação de *Osaap1* no processo de remobilização de N para os grãos em arroz com os dados observados, sendo necessárias mais análises.

AGRADECIMENTOS

Ao CPGA-CS, CAPES, CNPQ pelo apoio financeiro e ao laboratório de nutrição mineral de plantas da UFRRJ.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, S.L.; SCHEPERS, J.S. A simple roller-mill grinding procedure for plant and soil samples. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35: 537-545, 2004.

Assistat 7.7 beta.

Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils.

NOGUEIRA, A.R.A.; SOUZA, G.B. Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária, 2005. 313p.

SCHMIDT, R.; STRANSKY, H. and KOCH, W. The amino acid permease *AAP8* is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. 226:805-813, 2007.

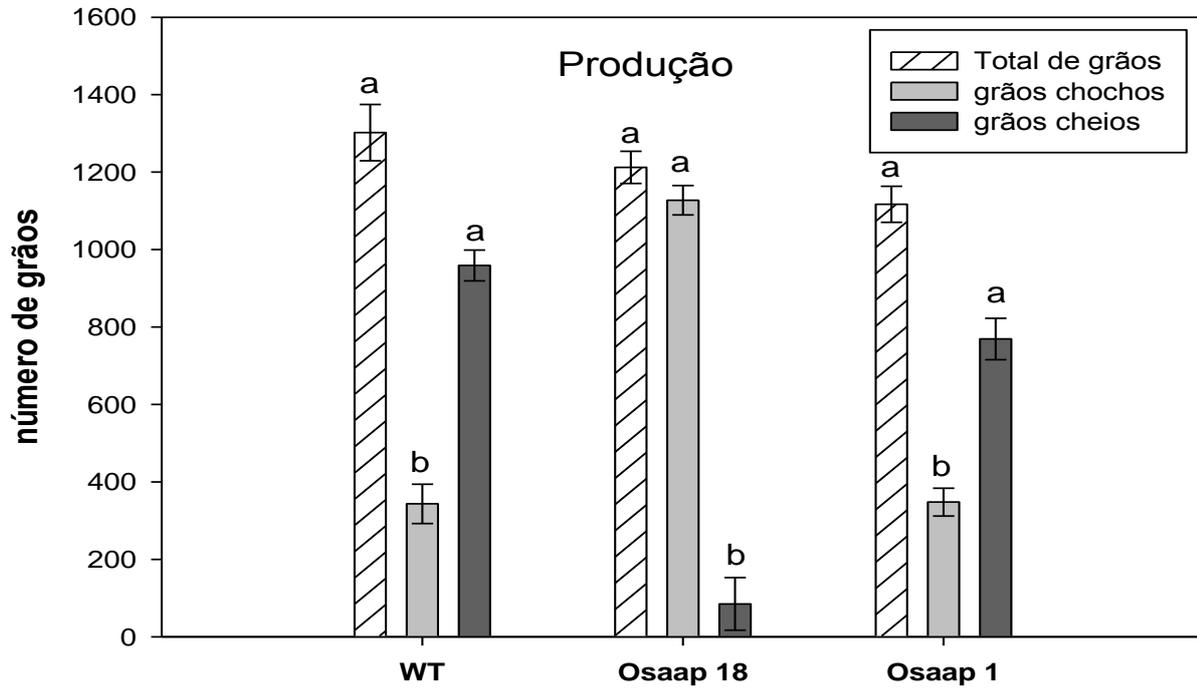


Figura 1. Total de grãos, grãos cheios e chochos das plantas mutantes 3A-00581, 4A-00262 e das plantas selvagens.

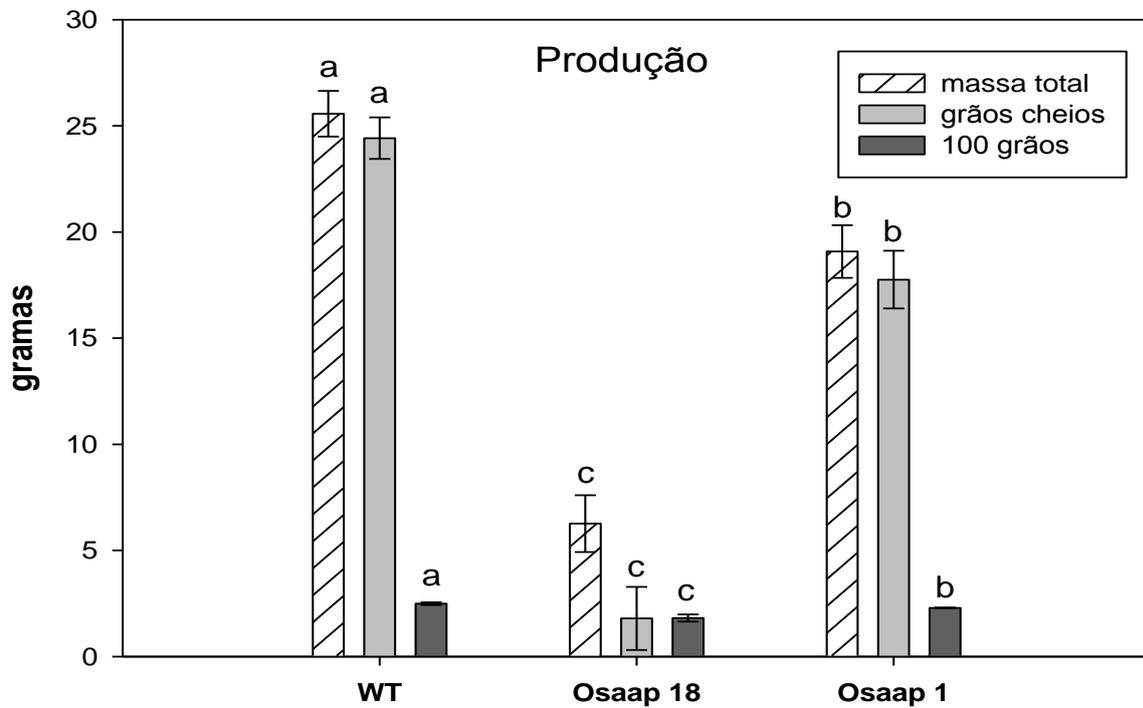


Figura 2. Massa total dos grãos, massa dos grãos cheios e de 100 grãos, das plantas mutantes 3A-00581 (Osaap 18), 4A-00262 (Osaap 1) e das plantas selvagens.