



Caracterização transcricional dos processos de aquisição de nitrato e amônio nas raízes de três gramíneas forrageiras⁽¹⁾.

Cristiane Prezotto Silveira⁽²⁾; Joni Esrom Lima⁽³⁾; José Lavres Jr⁽⁴⁾; José Albertino Bendassoli⁽⁴⁾; Antonio Vargas de Oliveira Figueira⁽⁴⁾; Adibe Luiz Abdalla⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES).

⁽²⁾ Pós-Doutoranda; Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo; Piracicaba, São Paulo; crispsad@gmail.com; ⁽³⁾ Pós-Doutorando; Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo;

⁽⁴⁾ Professor; Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo.

RESUMO: Estudos de absorção de nitrogênio (N) relacionados às técnicas moleculares para caracterização dos genes diferencialmente expressos para o uso eficiente de N é uma abordagem promissora na elucidação dos mecanismos que controlam a absorção, distribuição e remobilização do N em plantas. Foi avaliada a absorção de nitrato e amônio por meio de técnicas isotópicas nas raízes dos capins *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria ruziziensis* e Massai (*Panicum maximum* x *Panicum infestum*). Transportadores de nitrato (NRTs) e de amônio (AMTs) foram definidos e submetidos à técnica RT-qPCR para verificar sua expressão. Os resultados sugerem que a *B. decumbens* foi eficiente em absorver N tanto na forma de nitrato como amônio, já o capim Massai foi eficiente em absorver N na forma de amônio e a *B. ruziziensis* foi o capim menos eficiente em absorver N. As expressões dos transportadores de nitrato (NRTs) e de amônio (AMTs) não evidenciaram a preferência do capim Massai pelo amônio e da *B. decumbens* pelo nitrato e amônio. Infere-se que as maiores expressões dos AMTs e NRTs ocorram nas raízes submetidas num tempo inferior aos três dias de ausência de N na solução nutritiva.

Termos de indexação: capim, nitrogênio, RT-qPCR.

INTRODUÇÃO

Reduzir a entrada de fertilizantes no cultivo de plantas, melhorando a eficiência de uso do N (EUN) é uma das principais metas da pesquisa em nutrição mineral de plantas (Hirel et al., 2007). O estudo da eficiência de absorção de N pode ser feito a partir de técnicas isotópicas, pois possibilita o acompanhamento do nutriente nos diferentes compartimentos do sistema em estudo (Boaretto et al., 2004). Existem diversos caminhos para aumentar a EUN, um dos mais simples é a diminuição nas doses de adubos para níveis que sejam produtivos e seguros (Fernandez et al., 1998). Outra possibilidade é o melhoramento genético que proporcionaria aumento na produção

em sistemas agrícolas com baixa utilização de insumos (Ceccarelli, 1996).

As técnicas da biologia molecular permitem identificar e caracterizar proteínas de interesse, bem como os genes, e principalmente, elucidar as suas funções no metabolismo celular (Wilkins et al., 1995). Nesse contexto, a absorção de N é modulada por proteínas transportadoras de amônio e nitrato presentes na membrana plasmática de acordo com a disponibilidade de N no solo e da demanda de N pela planta (Alcantara et al., 2009). A absorção de N pelas raízes ocorre por meio de sistemas de absorção de alta afinidade (HATS) que adquirem N em concentrações inferiores a 1 mM, enquanto que os transportadores de baixa afinidade (LATS) absorvem N de concentrações superiores a 1 mM (Glass et al., 2002).

De acordo com Loqué & Von Wirén (2004), foi identificada em *Arabidopsis thaliana* uma família de cinco genes que codificam transportadores de amônio, identificados como AMT1;1 a AMT1;5, por outro lado, em tomate, apenas três genes AMT1 foram isolados e em arroz foram identificados dez genes AMT1. Portanto, esses autores concluem que cada planta forma o seu sistema de transporte de amônio de acordo com a seleção a que foi submetida. Em *Arabidopsis*, foram identificadas duas famílias de genes que codificam os transportadores de nitrato, denominados NRT1 e NRT2. Os genes NRT1 têm uma ampla faixa de substratos com afinidades que incluem os LATS e transportadores de nitrato com dupla afinidade (Guo et al., 2002). Estudos de expressão gênica e mutantes evidenciam que as proteínas NRT2 contribuem para os HATS quando a concentração de nitrato no solo é muito baixa (Little et al., 2005).

Os objetivos foram avaliar a absorção de N por meio de técnicas isotópicas com nitrato marcado ($^{15}\text{NO}_3^+$) e com amônio marcado ($^{15}\text{NH}_4^+$). Identificar e caracterizar o perfil transcricional dos genes ortólogos das famílias dos transportadores de nitrato e amônio via análise quantitativa de transcritos (qRT-PCR) para as gramíneas forrageiras *B. ruziziensis*, *B. decumbens* e Massai.



MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, em Piracicaba-SP. As gramíneas forrageiras *B. Ruziziensis*, *B. decumbens* e Massai foram cultivadas em 1,0 L de solução nutritiva com 2,0 mmol L⁻¹ de N, tendo o NH₄NO₃ como fonte de nitrogênio e os demais nutrientes em mmol L⁻¹: 0,2 de NaH₂PO₄; 1,2 de KCl; 1,0 de CaCl₂; 0,4 de MgSO₄; 0,2 de micronutrientes (H₃BO₃ = 1,54 g L⁻¹; MnSO₄.H₂O = 0,34 g L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O = 0,57 g L⁻¹; CuSO₄.5H₂O = 0,125 g L⁻¹ e MoO₃ = 0,081 g L⁻¹) e 0,2 de Fe-EDTA. A solução nutritiva foi renovada a cada 3 dias. Na última troca de solução nutritiva, aos 24 dias após o transplântio das mudas, metade das amostras ficaram desprovidas de N por três dias. Para o experimento de absorção de N, as raízes de três plantas dos capins ficaram imersas por 10 minutos em soluções nutritivas contendo ¹⁵N nas concentrações de 0,2 e 2,0 mmol L⁻¹. Para a quantificação de nitrato, as soluções com ¹⁵N foram preparadas com K¹⁵NO₃ marcado com 99,7% de átomos em excesso de ¹⁵N e para o amônio utilizou-se (¹⁵NH₄)₂SO₄ marcado com 96,6% de átomos em excesso de ¹⁵N. Os demais nutrientes foram empregados como descrito anteriormente. A relação isotópica ¹⁵N/¹⁴N nas amostras enriquecidas com ¹⁵N foi determinada em espectrômetro de massa e os valores obtidos foram convertidos em micromoles por grama de massa seca por hora de absorção. Para o experimento de expressão gênica, os iniciadores (primers) foram desenhados e adquiridos para corroborar via Rt-qPCR aos dados de absorção de N. O RNA total das amostras (100 mg) foi extraído utilizando-se o cloreto de lítio (LiCl), quantificado em NanoDrop e sua integridade confirmada via eletroforese. Cerca de 2 µg do RNA de cada amostra foi tratada com 1 µL de DNase, 2 µL de RNaseout e água ultrapura DEPC, em reação incubada a 37°C por 30 min. Adicionou-se EDTA, e incubada a 65°C por 10 min. Para a reação de síntese de cDNA, foram adicionados nas amostras de 10 µg de RNA total, 1,0 µL de oligo dT e 1,0 µL de dNTP, conduzindo a reação no termociclador à 65°C por 5 min. Finalmente, adicionou-se 4,0 µL de buffer, 0,5 µL de Ribolock, 1,0 µL de Rivertaid e 2,5 µL de água DEPC, mantendo-se a reação a 50°C por 30 minutos, seguido por 5 minutos à 85°C. A análise de RT-qPCR foi realizada no RotorGene-3000, utilizando reações contendo 5 µL de KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit, 0,5 µL de cada iniciador (5 µM), 1 µL do cDNA 2:8 (v:v) e água Milli-Q estéril, sendo que foram feitas triplicatas para cada combinação gene/amostra e utilizou-se o gene actina como referência (standard).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a capacidade de absorção de nitrato e amônio pelas raízes das gramíneas forrageiras, estudos de influxo rápido de nitrato ou amônio marcado (Short-Term Uptake; Loqué et al., 2006) foram realizados em condições contrastantes de disponibilidade de N. Os capins foram crescidos por 25 dias em condições de suficiência de N, e então submetidos aos tratamentos de suficiência (+N; 2 mM de NH₄NO₃) ou deficiência de N (-N) por três dias e em seguida estudos de cinética de absorção com N marcado (¹⁵N-nitrato e ¹⁵N-amônio) foram realizados em solução nutritiva, na faixa de concentração de ativação do sistema de absorção de alta-afinidade-HATs (0,2 mM de ¹⁵N) e de baixa-afinidade-LATs (2 mM de ¹⁵N). Análises de influxo rápido de ¹⁵N em raízes demonstraram que o capim Massai absorveu maiores quantidades de N na forma de amônio do que na forma de nitrato em todos os tratamentos, o mesmo foi observado para a *B. ruziziensis*, com exceção do tratamento (+N; 2 mM de ¹⁵N), em que esse capim absorveu mais nitrato do que amônio. Já a *B. decumbens* absorveu nitrato e amônio em quantidades semelhantes, exceto para o tratamento (-N; 0,2 mM de ¹⁵N) em que a quantidade de amônio absorvida foi superior a de nitrato (**Figura 1**). Rossiter-Rachor et al. (2009) constataram que a gramínea forrageira *Andropogon gayanus* absorveu preferencialmente amônio comparado ao nitrato.

Em plantas, a absorção de nutrientes é mediada por famílias de transportadores de membrana. No caso do amônio, sua absorção é realizada por meio de proteínas transportadoras de amônio (AMTs). Dos transportadores AMT1;1, AMT1;3 e AMT2;1 expressos nas raízes dos capins (**Figura 2**) sabe-se que o AMT1;1 e AMT1;3 tem papel chave na absorção de amônio e são expressos em células mais externas das raízes, como pêlos radiculares, sendo os principais responsáveis pela aquisição de amônio (Loqué et al., 2006). O transportador AMT2;1 foi expresso apenas nas raízes das *Brachiaria* e não expresso no Massai, porém em arroz Suenaga et al. (2003) revelaram que a expressão desse gene é constitutiva em raízes e folhas independente do tratamento aplicado.

A absorção de nitrato é mediada por proteínas pertencentes a família multigênica NRTs, assim, na tentativa de compreender a causa dessa reduzida capacidade de absorção de nitrato pelas raízes dos capins, foi avaliada a expressão relativa dos transportadores de nitrato NRT1;1, NRT1;2 e NRT2;1 (**Figura 3**). O principal transportador de nitrato é o NRT1;1, pois possui dupla afinidade de absorção ao nitrato, apresentando alta afinidade (µM) ou baixa afinidade (mM) dependendo do



estado de fosforilação da proteína (Liu & Tsay, 2003). Apesar da sua importância, o NRT1;1 não foi expresso nas raízes da *B. ruziziensis*, apenas foi constatado nas raízes da *B. decumbens* e do Massai. Além disso, NRT1;1 é capaz de regular a expressão do transportador de alta afinidade-HATS NRT2;1 (Munõs et al., 2004), este por sua vez não foi expresso nas raízes do Massai, somente para os capins do gênero *Brachiaria*. O transportador NRT1;2 está relacionado ao influxo de nitrato em baixa afinidade-LATs (Gojon et al., 2009) e este gene foi constatado nas raízes dos capins.

CONCLUSÕES

O estudo de absorção de ^{15}N pelas raízes das gramíneas forrageiras indica que a *B. decumbens* tem capacidade semelhante de absorver N tanto na forma de amônio como nitrato. O Massai é mais eficiente em absorver N na forma de amônio e dentre os capins avaliados, a *B. ruziziensis* é o capim menos eficiente em absorver N. Os transportadores de amônio (AMTs) e nitrato (NRTs) não representaram o influxo de N pelos capins, infere-se que o processo de absorção de nitrato e amônio pelas raízes seja mais rápido, indicando que maior acúmulo dos transcriptos dos genes NRTs e AMTs possa ser observado num tempo inferior as 72 h de deficiência de N na solução nutritiva.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a CAPES pela bolsa de estudos da primeira autora e auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

ALCANTARA, R.M.C.M.; SOUSA, S.R.; XAVIER, G.R. et al. Mecanismos bioquímicos, fisiológicos, moleculares relacionados com a eficiência de uso de nitrogênio em leguminosas e gramíneas. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2009. 39p. (Embrapa Meio-Norte. Documentos 195).

BOARETTO, A.E.; TRIVELIN, P.C.O.; MURAOKA, T. Uso de isótopos como traçadores em fertilidade do solo e nutrição de plantas. In: FERTBIO 2004, 2004, Anais. Lages: UDESC, 2004. CD-ROM

CECCARELLI, S. Adaptation to low/high input cultivation. *Euphytica*, 92:203-214, 1996.

FERNANDEZ, J.E.; MURILLO, J.M.; MORENO, F. et al. Reducing fertilization for maize in Southwest Spain. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 29:2829-2840, 1998.

GLASS, A.D.M.; BRITTO, D.T.; KAISER, B.N. et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53:855-864, 2002.

GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J.C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12:328-338, 2009.

GUO, F.Q.; WANG, R.; CRAWFORD, N.M. The Arabidopsis dual-affinity nitrate transporter gene AtNRT1.1 (CHL1) is regulated by auxin in both shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, 53:835-844, 2002.

HIREL, B.; LE GOUIS, J.; NEY, B. et al. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany*, 58:2369-2387, 2007.

LITTLE, D.Y.; RAO, H.; OLIVA, S. et al. The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America*, 102:13693-13698, 2005.

LIU, K.-H.; TSAY, Y.-F. Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO Journal*, 22:1005-1013, 2003.

LOQUÉ, D. & VON WIRÉN, N. Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots: regulatory aspects of nitrogen assimilation. *Journal of Experimental Botany*, 55:1293-1305, 2004.

LOQUÉ, D. YUAN, L.; KOJIMA, S. et al. Additive contribution of AMT1;1 and AMT1;3 to high-affinity ammonium uptake across the plasma membrane of nitrogen-deficient Arabidopsis roots. *Plant Journal*, 48:522-534, 2006.

MUNÕS, S.; CAZETTES, C.; FIZAMES, C. et al. Transcript Profiling in the chl1-5 Mutant of Arabidopsis Reveals a Role of the Nitrate Transporter NRT1.1 in the Regulation of Another Nitrate Transporter, NRT2.1. *Plant Cell*, 16:2433-2447, 2004.

ROSSITER-RACHOR, N.A.; SETTERFIELD, S.A.; DOUGLAS, M.M. et al. Invasive *Andropogon gayanus* (gamba grass) is an ecosystem transformer of nitrogen relations in Australian savanna. *Ecological Applications*, 19:1546-1560, 2009.

SUENAGA, A., MORIYA, K., SONODA, Y. et al. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter OsAMT2 in rice plants. *Plant and Cell Physiology*, v.44, p.206-211, 2003.

WILKINS, M.R.; SANCHEZ, J.C.; GOOLEY, A.A. et al. Progress with proteome projects: Why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, 13:19-50, 1995.

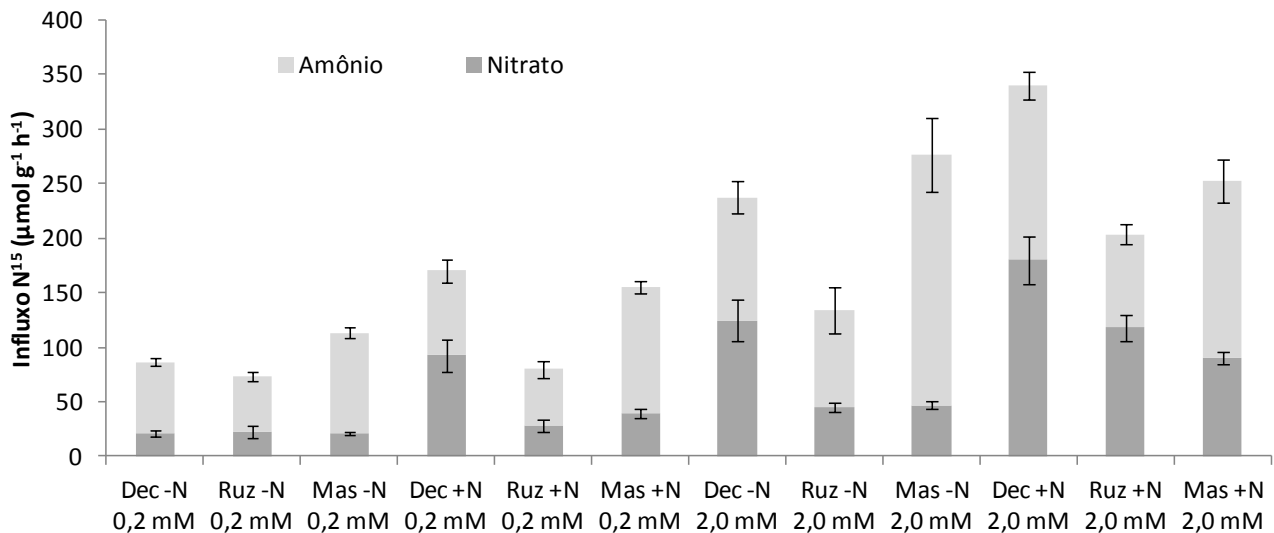


Figura 1 – Absorção de nitrogênio (influxo de ^{15}N) na forma de nitrato e amônio pelos capins *B. decumbens* (Dec), *B. ruziziensis* (Ruz) e Massai (Mas) na presença de nitrogênio (+N) ou ausência de nitrogênio (-N) na solução nutritiva três dias antes das raízes entrarem em contato com a solução externa de 0,2 mmol L⁻¹ (HATs) e 2,0 mmol L⁻¹ (LATs).

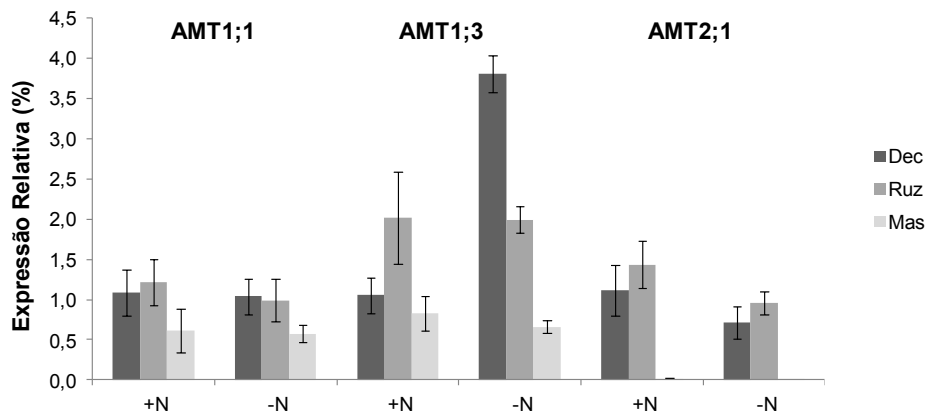


Figura 2 – Expressão relativa de genes transportadores de amônio (AMTs) nas raízes dos capins *B. decumbens* (Dec), *B. ruziziensis* (Ruz) e Massai (Mas) cultivados em 2,0 mM de nitrato de amônio (+N) ou em deficiência de nitrogênio por três dias (-N).

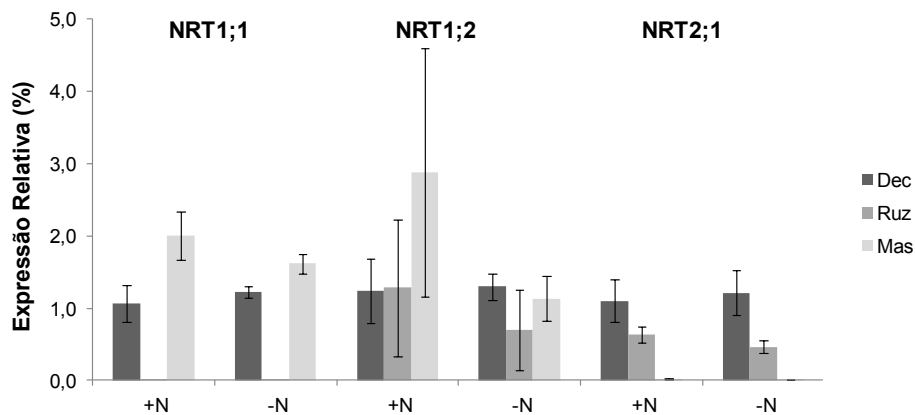


Figura 3 – Expressão relativa de genes transportadores de nitrato (NRTs) nas raízes dos capins *B. decumbens* (Dec), *B. ruziziensis* (Ruz) e Massai (Mas) cultivados em 2,0 mM de nitrato de amônio (+N) ou em deficiência de nitrogênio por três dias (-N).