

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**Metilação Diferencial do DNA e Metabolismo do
Nitrogênio em Variedades de Arroz Submetidas a Alto e
Baixo Suprimento de Nitrato**

Leilson Novaes Arruda

2014



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

**METILAÇÃO DIFERENCIAL DO DNA E METABOLISMO DO
NITROGÊNIO EM VARIEDADES DE ARROZ SUBMETIDAS A
ALTO E BAIXO SUPRIMENTO DE NITRATO**

LEILSON NOVAES ARRUDA

Sob a Orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

e Co-orientação do Professor
Carlos Alberto Bucher

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

633.18
A779m
T

Arruda, Leilson Novaes, 1986-
Metilação diferencial do DNA e metabolismo do nitrogênio em variedades de arroz submetidas a alto e baixo suprimento de nitrato / Leilson Novaes Arruda. – 2014.
67 f.: il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo, 2014.
Bibliografia: f. 42-46.

1. Arroz - Cultivo – Teses. 2. Arroz – Genética - Teses. 3. Nitrogênio - Fixação – Teses. 4. Plantas - Nutrição - Teses. I. Souza, Sonia Regina de, 1962- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

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

LEILSON NOVAES ARRUDA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciências do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 21/02/2014

Sonia Regina de Souza. Dr. UFRRJ
(Orientadora)

André Marques dos Santos. Dr. UFRRJ

Claudete Santa-Catarina. Dra. UENF

DEDICATÓRIA

A Deus e a Nossa Senhora pelo amor incondicional, pelo dom da vida, por todas as oportunidades que me foram dadas e por conduzirem meus caminhos.

Aos meus pais Lenilson Cardoso Arruda e Josileia Novaes Arruda pelo esforço feito para que eu pudesse alcançar meus objetivos, pelo amor que me foi dado e por sempre me apoiarem em minhas decisões.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo;

A minha Orientadora Sonia Regina de Souza pela amizade, por ter me acolhido e orientado, pelos ensinamentos, conselhos e apoio na condução das pesquisas;

Ao meu Co-orientador Carlos Alberto Bucher pela amizade, orientação, ensinamentos, conselhos e apoio na condução das pesquisas;

Ao professor Leandro Azevedo Santos pela amizade, orientação, ensinamentos, conselhos e apoio na condução das pesquisas;

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes pelos ensinamentos e por todo apoio que me foi dado;

Ao professor Valdir Diola (*in memoriam*) pelo apoio e conselhos na condução das pesquisas,

A todos os meus amigos do laboratório de Nutrição Mineral de Plantas: Orlando Tavares, Rafael Rangel, Osmário Araújo, Leandro Martins, Cassia Coelho, Vinicius Miranda, Luiziene Soares, Marcus Sperandio, Marcela Jacques, Flávia Caldeira, Elizabeth Ramos e Mariam Stark pela amizade e pelo apoio na realização dos trabalhos;

A bolsista de iniciação Sara Brasil pela amizade e pelo apoio na execução dos trabalhos;

A todos os bolsistas de iniciação pela ajuda na execução dos trabalhos;

A todos os funcionários do Departamento de solos pelos serviços prestados;

Ao CPGA-CS pela coordenação, apoio e atenção;

Ao CNPq e a FAPERJ pelo fomento;

A todos que de certa forma colaboraram para que este trabalho pudesse ser realizado.

BIOGRAFIA

Leilson Novaes Arruda nasceu na cidade de Araruama – RJ, em 19 de março de 1986. Concluiu o ensino médio no CIEP 258 Astrogildo Pereira – RJ em 2003. Iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 2007, diplomando-se em 2012. Durante a graduação foi monitor das disciplinas Estatística Básica e Introdução a Estatística durante três semestres e posteriormente bolsista de Iniciação Científica por 18 meses no Laboratório de Genética e Melhoramento Vegetal do Instituto de Biologia e por 1 ano no Centro Integrado de Manejo de Pragas estudando tolerância do tomateiro a *Neoleucinodes Elegantis* sob a orientação dos professores Mauricio Ballesteiro Pereira e Elen de Lima Aguiar-Menezes. Em 2012 ingressou no Mestrado em Agronomia – Ciência do Solo pela UFRRJ na área de Nutrição de Plantas, sob a orientação da Professora Sonia Regina de Souza.

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1:** Sequências dos *primers* (iniciadores) *forward* e *reverse* usados nas reações de PCR em tempo real para os genes de três transportadores de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.1* a 2.3), três transportadores de nitrato de baixa afinidade (*OsNRT1.1*, 1.2 e 1.4), proteína NAR (*OsNAR2.1* e 2.2) e os genes de referencia Actina (*OsAct2*) e Ubiquitina 5(*UBQ5*) de arroz e números de acesso no banco de dados do NCBI. 16
- Tabela 2.** Massa seca de raiz (g/vaso) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com N-NO₃⁻: 0,2 mM constante e ressuprimento com 0,2 mM e 2 mM após 72 h em solução sem NO₃⁻. 18
- Tabela 3.** Massa seca de parte aérea (g/vaso) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa, cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com N-NO₃⁻: 0,2 mM constante e ressuprimento com 0,2 mM e 2 mM após 72 h em solução sem N. 19
- Tabela 4.** Relação raiz/parte (g/vaso) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com N-NO₃⁻: 0,2 mM constante, e ressuprimento com 0,2 mM e 2 mM após 72 h em solução sem N. . 19
- Tabela 5.** Parâmetros cinéticos (V_{máx} e K_M) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com N-NO₃⁻: 0,2 mM constante, 0,2 mM ressuprimento após 72 h de deficiência..... 20
- Tabela 6.** Parâmetros cinéticos (V_{máx} e K_M) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução com ressuprimento de 2 mM N-NO₃⁻ após 72 h em solução sem N. 21
- Tabela 7.** Massa fresca de raiz e parte aérea, relação raiz/ parte aérea das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. 23
- Tabela 8.** Resumo do ajuste de protocolo para a análise do perfil de restrição sensível a metilação (MSAP) 31
- Tabela 9.** Total de bandas amplificadas para cada tratamento e tipo de metilação CG, CHG e RNM (regiões não metiladas), obtidas por meio da técnica de MSAP em raízes de plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM e 0,2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Fora dos parênteses se encontram os valores observados e dentro dos parentes os valores esperados..... 36
- Tabela 10.** Resultado da análise consistência do agrupamento em quatro métodos de agrupamento hierárquicos por meio do programa estatístico R com base na distância de Jaccard para quatro variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM (A) e 0,2 mM (B) constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Os dados foram obtidos por meio da técnica de MSAP. 37

Tabela 11. Similaridade epigenética (índice de Jaccard) entre quatro variedades de arroz: IAC 47, Manteiga, Caiapó e Piauí. As plantas foram submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM (A) e 0,2 mM (B) constante, e coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.....	37
Tabela 12. Teores de nitrato, amônio, N-amino, porcentagem de açúcares solúveis, N-proteico e N-total em folhas das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.....	49
Tabela 13. Teores de nitrato, N-amino, porcentagem de açúcar, N-total e N-total reduzido em bainha das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.	49
Tabela 14. Teores de nitrato, N-amino, porcentagem de açúcar, N-total e N-total reduzido em raízes das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistemas de absorção de NO_3^- (NRT: Nitrate transporter) de alta (NRT2) e baixa afinidade (NRT1). cHATS (constitutivos); e iHATS (induzíveis). Fonte: Fernandes e Souza (2006). 4
- Figura 2.** Metilação da citosina na posição 5 formando 5-metil citosina (Devlin, 2011) 6
- Figura 3.** Esquema representando a ação das enzimas MspI e HpaII. Ambas as enzimas reconhecem o sítio de restrição 5'-CCGG, porém a HpaII se torna inativa se uma das citosinas estiver metilada em ambas as fitas, enquanto que a MspI se torna inativa em sequências 5'-^mCCGG. Adaptado de: García et al, 2010. 9
- Figura 4.** Esboço do procedimento da técnica de "Methylation-sensitive amplified polymorphisms" (MSAPs). (1) Fragmentos de DNA são gerados após a restrição com a dupla de enzimas EcoRI e MspI/HpaII (as setas em azul representam os sítios de reconhecimento para a enzima EcoRI e em vermelho para as enzimas MspI ou HpaII); (2) ligação dos adaptadores para EcoRI (em azul) e MspI ou HpaII (em vermelho) aos fragmentos de extremidade coesiva gerados após a restrição; (3) PCR de pré amplificação utilizando primers correspondentes a sequência dos adaptadores, podendo conter uma ou nenhuma base seletiva (N); (4) PCR seletiva utilizando os mesmos *primers* da PCR de pré amplificação, porém com uma, duas ou três bases seletivas (N) e (5) separação dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Adaptado de: Vuylsteke et al., (2007). 10
- Figura 5.** Esquema experimental utilizando plantas das variedades arroz IAC 47, Piauú, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa. As coletas foram realizadas no 22° DAG para determinação dos parâmetros cinéticos de absorção ($V_{\text{máx}}$ e K_m). 12
- Figura 6.** Esquema do experimento para avaliação do perfil de metilação em plantas de arroz cultivadas sob dois níveis de N-NO_3^- . DAG: dias após germinação, FI: força iônica. Baixo suprimento de N (0,2 mM N-NO_3^-), Suprimento normal de N (2 mM N-NO_3^-). 13
- Figura 7.** K_m das variedades de arroz IAC 47, Piauú, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa submetidas aos tratamentos: 0,2 mM constante e ressuprimento com 0,2 mM, divididas em dois grupos: grupo 1, não houve diferença significativa e grupo 2 houve diferença significativa para o parâmetro cinético K_m entre os dois tratamentos. 21
- Figura 8.** Teores de nitrato (N-NO_3^-) e amônio (N-NH_4^+) na folha (A e B), bainha (C) e raiz (D) das variedades de arroz IAC 47, Piauú, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Mesma letra maiúscula não difere significativamente entre si para o tratamento de 2 mM constante e mesma letra minúscula difere significativamente entre si para o tratamento de 0,2 mM constante (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão. 25
- Figura 9.** Teores de N-amino e porcentagem de açúcar na folha (A e B), bainha (C e D) e raiz (E e F) das variedades de arroz IAC 47, Piauú, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Mesma letra maiúscula não difere significativamente entre si para o tratamento de 2 mM constante e mesma letra

- minúscula difere significativamente entre si para o tratamento de 0,2 mM constante (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão. 26
- Figura 10.** Porcentagem de N-total e de N- total reduzido na folha (A e B), bainha (C e D) e raiz (E e F) das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Mesma letra maiúscula não difere significativamente entre si para o tratamento de 2 mM constante e mesma letra minúscula difere significativamente entre si para o tratamento de 0,2 mM constante (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão. 27
- Figura 11.** Expressão dos transportadores de nitrato em raízes de plantas de arroz das variedade IAC-47, Caiapó, Manteiga e Piauí submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão. 29
- Figura 12.** Gel de acrilamida 5% para avaliar o perfil de restrição sensível a metilação em raízes das variedades de arroz Manteiga (1, 2, 3, 4), IAC 47 (5, 6, 7 e 8), Caiapó (9, 10, 11 e 12) e Piauí (14, 15, 16) submetidas ao tratamento com 0,2 mM constante de nitrato coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. C= controle (feito com água ao invés de DNA). Os números 1 e 2 indicam a presença de metilação do tipo CHG. 32
- Figura 13.** Gel de acrilamida 5% para avaliar para avaliar o perfil de restrição sensível a metilação em raízes das variedades de arroz Manteiga (18, 19 e 20), IAC 47 (21, 22, 23 e 24), Caiapó (25, 26, 27 e 28) e Piauí (29, 30, 31 e 32) submetidas ao tratamento com 2 mM constante de nitrato coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva..... 33
- Figura 14.** Porcentagem de metilação CHG (A) e CG (B), porcentagem de sítios 5'-CCGG metilados (C), regiões não metiladas (D) e total de bandas não amplificadas (E) obtidas por meio da técnica de MSAP em raízes de plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM e 0,2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. 35
- Figura 15.** Dendograma de similaridade construído usando unweighted-pair group method with arithmetic averaging (UPGMA) baseado nas marcas obtidas na técnica de MSAP em raízes das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM (A) e 0,2 mM (B) constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. 38
- Figura 16.** Curvas de depleção de nitrato das variedades Manteiga, Mira e Piauí cultivada durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os tratamentos: 0,2 mmol L⁻¹ constante e ressuprimento com 0,2 mmol L⁻¹ após 72 h de deficiência. 46
- Figura 17.** Curvas de depleção de nitrato das variedades Três Meses, Caiapó, Cana Roxa, IAC 47 cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os tratamentos: 0,2 mmol L⁻¹ constante e ressuprimento com 0,2 mmol L⁻¹ após 72 h de deficiência. 47

Figura 18. Curvas de depleção de nitrato das variedades Três Meses, Caiapó, Cana Roxa, IAC 47, Manteiga, Mira e Piauí cultivada durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução com ressuprimento de 2 mM N-NO₃⁻ após 72 h de deficiência.
.....48

LISTA DE SÍMBOLOS

AFLP	Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos Amplificados (Amplified Fragment Length Polymorphism)
AMT	Família de Genes para os Transportadores de NH_4^+
ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
CCC	Coefficiente de Correlação Cofenética
cDNA	DNA Complementar
CG	Citosina- Guanina
CHG	C – Citosina, H- Adenina, Timina ou Guanina, G- Guanina
CHH	C- Citosina, H- Adenina, Timina ou Guanina
CT	Ciclo Limite (Cycle Threshold)
DAG	Dia Após a Germinação
DEPC	Dietilpirocarbonato (Diethylpyrocarbonate)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DNMT	DNA Metil Transferase
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (Ethylenediamine Tetraacetic Acid)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUN	Eficiência no Uso de Nitrogênio
FAD	Flavina Adenina Dinucleótido
FD	Ferredoxina
GOGAT	Glutamina Oxoglutarato Aminotransferase
GS	Glutamina Sintetase
HATS	Sistema de Transporte de Alta Afinidade (<u>H</u> igh <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
HCL	Ácido Clorídrico
K_M	Constante de Michaelis e Menten
LATS	Sistema de Transporte de Baixa Afinidade (<u>L</u> ow <u>A</u> ffinity <u>T</u> ransport System)
LiCl	Cloreto de Lítio
MoCo	Molibdênio - Cobalto
mRNA	RNA Mensageiro
MSAP	Análise de Polimorfismo Amplificado Sensível a Metilação (Methylation-Sensitive Amplication Polymorphism)
N	Nitrogênio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo reduzida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotideo Fosfato reduzida
NaOAc	Acetato de Sódio
NAR	Proteína que se associa aos HATS (Nitrogen Assimilation Related)
NH_4^+	Amônio
NiR	Nitrito Redutase
NO_3^-	Nitrato

NR	Nitrato Redutase
NRT1	Família de Genes dos Transportadores de NO ₃ ⁻ de Baixa Afinidade (Nitrate Transporter 1)
NRT2	Família de Genes dos Transportadores de NO ₃ ⁻ de Alta Afinidade (Nitrate Transporter 2)
NTES	Tampão NaCl/Tris/EDTA/SDS
PCR	Reação em cadeia de Polimerase (Polimerase Chain Reaction)
RdDM	Metilação direcionada por RNA (RNA Directed DNA Methylation)
RNA	Ácido Ribonucleico (Ribonucleic Acid)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio (Sodium Dodecyl Sulfate)
siRNAs	Pequenos e interferentes RNAs (Small Interferent RNA)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
VCL ₃	Cloreto de Vanádio III
V _{max}	Velocidade Máxima de absorção
χ ²	Teste Estatístico do Qui-Quadrado

RESUMO

Arruda, Leilson Novaes. **Metilação diferencial do DNA e metabolismo do nitrogênio em variedades de arroz submetidas a alto e baixo suprimento de nitrato**. 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

O nitrogênio (N) é um dos elementos mais requeridos pelas plantas, sendo constituinte das principais moléculas dos sistemas biológicos. Portanto, grandes quantidades são aplicadas no solo com o intuito de maximizar a produtividade. Entretanto até 70% do N aplicado pode ser perdido por diferentes processos. Assim, identificar mecanismos bioquímicos e moleculares que possam aumentar a eficiência no uso do nitrogênio (EUN) pelas plantas é atualmente um dos principais desafios da nutrição mineral de plantas. Diversas técnicas moleculares têm sido usadas para estudar genótipos contrastantes quanto a EUN e identificar possíveis alvos biotecnológicos para essa característica. Ultimamente, tem sido observado que aspectos relacionados ao controle da expressão gênica, ou mais precisamente a epigenética, explica grande parte da adaptação das plantas frente a uma situação de estresse. Deste modo, esse trabalho teve como objetivo identificar as alterações no padrão de metilação do DNA em variedades de arroz contrastantes quanto ao teor de proteína nos grãos quando submetidas a alta e baixa dose de nitrato ($N-NO_3^-$). A expressão genica dos transportadores de NO_3^- e os metabólitos nitrogenados foram também avaliados. A disponibilidade de N durante o cultivo influenciou os padrões de metilação do DNA, que apresentou polimorfismo entre as variedades nas duas doses de $N-NO_3^-$ estudadas. As plantas de arroz sob baixa disponibilidade de N (0,2 mM constante) apresentaram predomínio de metilação do tipo CHG, enquanto que sob alta disponibilidade (2 mM constante) houve predomínio de metilação do tipo CG. A maior expressão de transportadores de NO_3^- de alta afinidade HATS ocorreu na variedade local Piauí. As variedades Piauí e Manteiga apresentaram aumento na relação raiz parte aérea, maior acúmulo de NO_3^- na bainha e raiz, maiores teores de N- amino, NH_4^+ e N total quando submetidas a baixa disponibilidade de N. As variedades Piauí e Manteiga são oriundas de cultivos com baixo uso de insumos por agricultores de subsistência do estado do Maranhão, e possivelmente os resultados encontrados aqui são reflexos da adaptação dessas variedades a condições de solo limitantes de N.

Palavras chave: Expressão gênica. Metabólitos nitrogenados. Metilação da citosina.

ABSTRACT

Arruda, Leilson Novaes. **Differential DNA methylation and nitrogen metabolism in rice plants submitted to high and low nitrate availability**. 2014. 67p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Nitrogen (N) is one of the elements most required by plants, and it constitutes the structure of the main macromolecules of the biological systems. In order to increase the grain yield, large amounts are applied in the soil. However, up to 50 to 70% of N applied maybe lost by several processes. To identify biochemistry and molecular mechanisms that might to increase nitrogen use efficiency (NUE) by plants is one of greatest challenges in plant mineral nutrition nowadays. Several molecular techniques have been used in order to study different genotypes related to NUE and to identify potential biotechnological targets for this characterisitic. Lately, it has been noted that aspects related to the control of gene expression, more precise the epigenetic, explains great part of the plant adaptation to stress. This study had as objective to identify the changes of the DNA methylation pattern in four rice varieties with different protein content in the grains, when submitted to high and low nitrate availability conditions. The gene expression of nitrate transporters and the nitrogen metabolites were also evaluated. During the experiment period, the N availability influenced in the DNA methylation pattern, and it showed polymorphism among the rice varieties in the two dosages of nitrate. The rice plants under low nitrogen availability (0.2 mM) showed predominance of the CHG type methylation, whereas when submitted to high availability (2 mM) they showed predominance of CG methylation. The higher expression of high affinity nitrate transporters was observed in the Piauí variety. The Piauí and Manteiga varieties showed an increase in the root shoot ratio, the highest nitrate amount in the sheath and root, the highest amino N, ammonium and total N amount, when submitted to low nitrate availability. The Piauí and Manteiga varieties originated from Maranhão State, where they are grown with low usage of fertilizers by subsistence crop farmers. This way, it is possible that this study results reflect the adaptation of this rice plants to limiting N soil conditions.

Key words: Gene expression. Nitrogen metabolites. Cytosine methylation.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Absorção e Metabolismo do N.....	3
2.2 Metilação do DNA	6
2.3 Análise de Polimorfismo Amplificado Sensível a Metilação (MSAP).....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Seleção das Variedades	11
3.1.1 Cinética de absorção de N.....	11
3.1.2 Determinação do teor de N-NO ₃ ⁻ em solução nutritiva (modificação do protocolo de Miranda et al., 2001).....	12
3.2 Análises de MSAP, Expressão dos Transportadores e Frações Solúveis	13
3.2.1 Cultivo das variedades selecionadas de arroz para análises de polimorfismo amplificado sensível a metilação, expressão gênica dos transportadores de nitrato e frações solúveis	13
3.2.2 Extração de DNA e RNA	13
3.2.3 Análise de polimorfismo amplificado sensível a metilação (MSAP).....	14
3.2.4 Síntese de cDNA	15
3.2.5 Reações de PCR em tempo real.....	15
3.2.6 Análises das frações nitrogenadas e açúcares solúveis.....	17
3.2.7 Análise estatística.....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Cinética de Absorção de N- NO ₃ ⁻	18
4.2 Análises de MSAP, Expressão dos Transportadores e Frações Solúveis	22
4.2.1 Seleção das variedades	22
4.2.2 Parâmetros morfológicos	22
4.2.3 Análises das frações nitrogenadas e açúcares solúveis.....	23
4.2.4 Análise da expressão gênica dos transportadores de NO ₃ ⁻ e da proteína NAR	28
4.2.5 Ajuste do protocolo para a análise de polimorfismo amplificado sensível a metilação (MSAP).....	31
4.2.6 Análise da alteração no padrão de metilação da citosina	32
4.2.7 Análise da similaridade epigenética das variedades de arroz por meio da distância de Jaccard	36
5 CONCLUSÕES	39
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
7 ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um dos mais importantes nutrientes para as plantas por sua participação em quase todos os processos biológicos (Kong et al., 2013). Devido a grande influência do N no crescimento vegetal grandes quantidades de N são aplicadas no solo com o intuito de maximizar a produção, porém as plantas geralmente consomem menos da metade do N aplicado no solo, e portanto, a maioria (50 a 70%) do N aplicado é perdido para a atmosfera ou por lixiviação para o lençol freático, lagos e rios, causando sérios problemas ambientais (Shi et al., 2010; Masclaux-Daubresse et al., 2010). A proporção do N aplicado na forma de fertilizante nas culturas de arroz é superior a dos outros cereais, pois há rápida volatilização e desnitrificação do N em sistemas de cultivo inundado (Shi et al., 2010). Reduzir as quantidades de fertilizantes aplicados e encontrar plantas com maior eficiência no uso de nitrogênio (EUN) é um dos principais objetivos atualmente da nutrição de plantas (Masclaux-Daubresse et al., 2010).

O arroz (*Oryza sativa L.*) é uma planta modelo para diversos estudos (Shi et al., 2010) e um dos cereais de maior importância no mundo, principalmente nos países em desenvolvimento devido ao fornecimento de carboidratos e proteínas importantes na dieta alimentar da população, constituindo o alimento básico para aproximadamente 2,4 bilhões de pessoas (Cancellier et al., 2011; Fidelis et al., 2011). Por apresentar um consumo crescente nos últimos anos, técnicas mais adequadas devem ser empregadas no seu cultivo com o intuito de melhorar a qualidade e aumentar a sua produção de forma sustentável (Cancellier et al., 2011; Fidelis et al., 2011).

Uma boa disponibilidade de N para plantas de arroz aumenta a área foliar, com consequente aumento na interceptação da radiação solar, aumentando a taxa fotossintética, influenciando diretamente no número de perfilhos, número de panículas, enchimento dos grãos, e produtividade (Cancellier et al., 2011; Fidelis et al., 2011).

O N pode ser absorvido tanto na forma orgânica (aminoácidos, peptídeos e proteínas) como inorgânica (nitrato, amônio e uréia), e suas concentrações podem variar dependendo do tipo de solo, temperatura e atividade de microorganismos (Wang et al., 2012).

Uma planta ideal é aquela que possui uma boa capacidade de absorção, e um bom desempenho em assimilar, reciclar e remobilizar o N orgânico, e com isso se desenvolver e produzir utilizando a menor quantidade de fertilizante nitrogenado possível (Chardon et al., 2012). Assim, o N tem sido cada vez mais estudado a fim de melhorar a eficiência na sua absorção e minimizar sua perda nos solos (Fidelis et al., 2011; Cancellier et al., 2011). Sendo assim, tem se intensificado a busca por variedades mais adaptadas ao estresse nitrogenado, ou seja, genótipos com maior eficiência no uso do N, para aumentar não só a produtividade, mas também diminuir os custos de produção e as perdas de N nos solos.

Diversas ferramentas são utilizadas com o intuito de melhorar a EUN, porém ainda faltam conhecimentos sobre a expressão de genes e regulação de compostos e processos em arroz sob baixa disponibilidade de N, o qual é essencial para o desenvolvimento de cultivares de arroz com uma alta eficiência no uso do N (Shi et al., 2010).

Estudos recentes demonstraram que mecanismos epigenéticos estão envolvidos na resposta das plantas a estresses ambientais, assim como a baixa disponibilidade de N (Kou et al., 2011; Yu et al., 2013; Cao et al., 2012). Segundo Avramova (2011), mecanismos epigenéticos regulam respostas a estresse e adaptação, senescência, doença e vários modelos da herança não Mendeliana e a plasticidade genômica é determinada pelo Epigenoma que é definido pelos perfis das modificações nas histonas e na metilação do DNA, tanto em plantas como animais.

A modificação dos nucleotídeos no DNA por ligações covalentes de grupos metil começou a ser descrita no final dos anos 40 e nos início dos anos 50. Nos anos 60 foi proposto que a metilação do DNA poderia estar envolvida em mecanismos de proteção contra a integração de DNAs invasores ou no processamento do DNA hospedeiro contra DNAs invasores a partir de DNAses. A ideia mais recente veio lado a lado com a descoberta das enzimas de restrição bacterianas, que protegem o DNA do hospedeiro bacteriano metilado de um DNA invasor bacteriano ou viral pela digestão específica do DNA parasita não modificado. Por volta de 1975 foi proposto que a metilação do DNA está conectada com a regulação transcricional, ou seja, alterando a expressão de genes (Brero et al. 2006).

A metilação do DNA é um dos principais componentes quando se trata de silenciamento dos genes em plantas. Estudos recentes têm demonstrado que a resistência de plantas a estresses bióticos e abióticos podem estar relacionados a alterações no padrão de metilação do DNA (Sha et al., 2005; Kou et al., 2011). Porém pouco se conhece sobre os efeitos da disponibilidade diferencial de N sob as alterações no padrão de metilação do DNA.

O estudo tem por objetivo identificar as alterações no padrão de metilação do DNA, analisar a expressão gênica e os metabólitos nitrato, amônio, N-amino, N-total e N-total reduzido em variedades de arroz em cultivos com disponibilidade diferencial de nitrato, bem como a sua influencia no metabolismo e adaptação dessas plantas a condições de estresse nitrogenado, tendo por hipótese que a disponibilidade diferencial de nitrato durante o cultivo influencia os padrões de metilação do DNA em variedades de arroz, com implicações sobre o metabolismo de nitrogênio e a expressão gênica durante a absorção desse nutriente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Absorção e Metabolismo do N

Aproximadamente 80% da atmosfera é constituída de N, porém esse N se encontra em forma muito estável (N_2) e indisponível para as plantas. Alguns microorganismos são capazes de fixar esse N atmosférico na forma de NH_4^+ que podem ser absorvidos pelas plantas (Maathuis, 2009). No solo a maior parte do N total (acima de 98%) se encontra na matéria orgânica, a qual está indisponível para as plantas. Apenas uma pequena fração se encontra na forma inorgânica, disponível para as plantas (Dechorgnat et al., 2011). A forma inorgânica em que o N se encontra no solo depende das condições ambientais. Em condições aeradas, o nitrato é a maior fonte de N, porém em sistema de arroz inundado a difusão de oxigênio pelas raízes, devido a tecidos especializados denominados aerênquimas que facilitam essa difusão, promove o processo de nitrificação em sua rizosfera e com isso ocorre a absorção de $N-NO_3^-$ pelas plantas de arroz mesmo nestas condições, tendo um significativo efeito positivo no desenvolvimento de plantas de arroz (Kirk & Kronzucker, 2005).

A maioria das plantas usa o N mineral dos solos, com exceção de algumas leguminosas que podem fixar o N atmosférico por meio da simbiose com bactérias. A absorção do N mineral (NO_3^- na maioria dos casos) é realizada através do sistema radicular, e após absorvido o NO_3^- é enviado para a parte aérea, onde é reduzido a amônio e em seguida incorporado a aminoácidos. A absorção de NO_3^- pelas raízes é realizada por proteínas pertencentes à família multigênica *NRT1* e *NRT2*, e a redução do NO_3^- e síntese de glutamina são realizadas por três principais enzimas: nitrato redutase (NR), nitrito redutase (NIR) e glutamina sintetase (GS) (Castaings et al., 2011).

Os transportadores de NO_3^- podem ser constitutivos ou induzidos pela presença de NO_3^- , e são classificados em dois sistemas de transporte de acordo com a sua afinidade pelo substrato: sistema de transporte de alta afinidade (HATS – *High Affinity Transport System*) e sistema de transporte de baixa afinidade (LATS - *Low Affinity Transport System*). O LATS atua em concentrações externas superiores a 1mM de NO_3^- e o HATS atua em concentrações externas inferiores a 1mM (Cerezo et al., 2001).

O *CHL1* e os demais membros da família *NRT1* participam do sistema de baixa afinidade (LATS), e os membros da família *NRT2* participam do sistema de alta afinidade, sendo os transportadores *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* induzidos pela presença de nitrato (iHATS) e os transportadores *AtNRT2.3*, *AtNRT2.4*, *AtNRT2.5*, *AtNRT2.6* e *AtNRT2.7* constitutivos (cHATS), ou seja, expressos independentemente da presença do NO_3^- (Figura 1) (Fernandes e Souza, 2006; Wang et al., 2012)

Estudos com plantas de plantas de plantas de *Arabidopsis* demonstraram que o *NRT1.1* (*CHL1*) é um transportador de nitrato de dupla afinidade expresso no córtex, epiderme e endoderme da raiz, e está envolvido não só no sistema de alta como baixa afinidade. A regulação da atividade de transporte do *NRT1.1* é efetuada pela fosforilação no seu resíduo de aminoácido Thr101, fosforilação essa regulada pela calcineurina B-like-interacting protein kinase CIPK23 (Wang et al., 2012). Quando o resíduo se encontra fosforilado o *NRT1.1* funciona como um transportador de alta afinidade (HATS), e quando o seu resíduo se encontra desfosforilado o *NRT1.1* funciona como um transportador de baixa afinidade (LATS) (Kraiser et al., 2010).

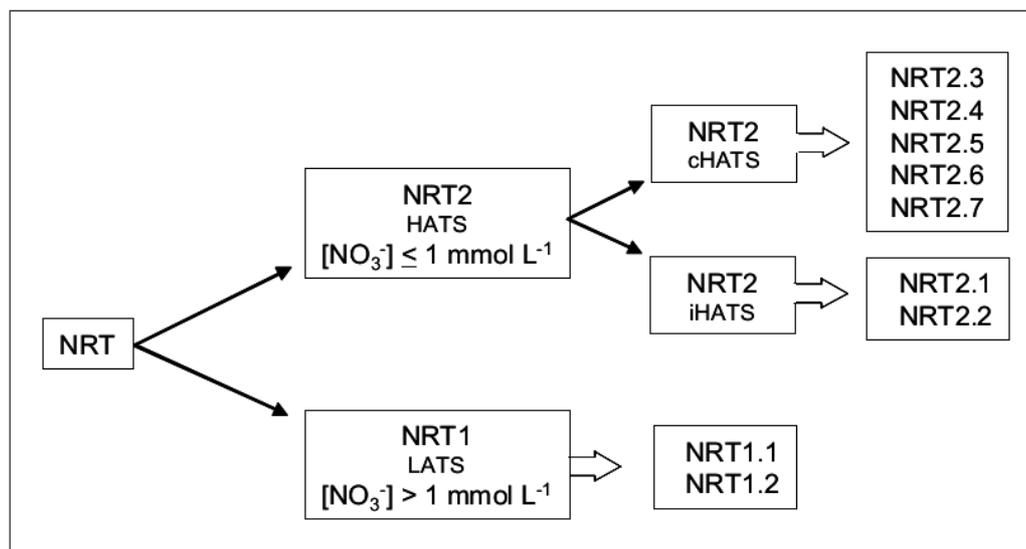


Figura 1. Sistemas de absorção de NO_3^- (NRT: Nitrate transporter) de alta (NRT2) e baixa afinidade (NRT1). cHATS (constitutivos); e iHATS (induzíveis). Fonte: Fernandes e Souza (2006).

O *NRT1.1* também está envolvido nos processos de sinalização os quais conduzem a mudanças no desenvolvimento das raízes, funciona com um sensor de nitrato para ativar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de nitrato, mudança na germinação de sementes, facilita o transporte de auxina em uma via reprimida pelo nitrato, e também reprime o crescimento de raízes laterais em baixa disponibilidade de nitrato (Dechorgnat et al., 2011).

Outro membro do sistema de baixa afinidade (LATS) com um distinto modelo de expressão é o *NRT1.2*, que não é expresso em todas as regiões da célula, tecidos ou órgãos, sendo apenas expresso especificamente nas células epidérmicas da raiz com um K_m para o NO_3^- por volta de 6 mM em ovócitos (Guo et al., 2011). E ao contrário da expressão induzida pelo nitrato do *NRT1.1*, o RNA mensageiro do *NRT1.2* acumula mesmo na ausência de nitrato, demonstrando ser um componente constitutivo do LATS (Dechorgnat et al., 2011).

Expresso na epiderme, córtex e endoderme das células das partes maduras da raiz, o *NRT2.1* tem sua proteína localizada na membrana plasmática e é um dos principais componentes do sistema HATS, principalmente em baixas concentrações de nitrato. Um segundo gene da família *NRT2*, o *NRT2.2* tem sua localização no cromossomo I próximo ao *NRT2.1* em *Arabidopsis*, porém tem apenas uma pequena participação no HATS, exceto na perda do *NRT2.1* (Dechorgnat et al., 2011).

A absorção do nitrato é regulada tanto em nível transcricional como pós transcricional. Os transportadores *CHL1* (*NRT1.1*), *NRT1.2*, *NRT2.1*, *NRT2.2* e *NRT2.4* tem suas expressões reguladas a níveis transcricionais pelo nitrato, nitrito, amônio, glutamina, fonte de N, luz, sacarose, ritmo circadiano e pH. E a existência de uma forte correlação entre a abundância de transcritos desses genes e a atividade de absorção de nitrato sugere que a regulação transcricional representa um papel importante na modulação da atividade de absorção desse íon (Wang et al., 2012). Como exemplo, o transportador *NRT2.1* tem sua expressão induzida pela baixa disponibilidade ou pela ausência de N, e é reprimido em altas concentrações de N em uma via envolvendo o transportador *NRT1.1* (Kraiser et al., 2010).

Alguns transportadores da família *NRT2* requerem uma associação com a proteína NAR2 para o transporte de nitrato em faixas de concentração relativamente baixas. Essa proteína interage com três transportadores *NRT* (*NRT2.1*, *NRT2.2* e *NRT2.3a*), não só com a proteína como também com o RNA mensageiro (mRNA), e representa um papel importante

na absorção de NO_3^- a baixas e altas concentrações (Xu et al., 2012). Análise de expressão identificou que os transcritos de *AtNAR2.1* são modulados principalmente pela quantidade de N na planta (Guo et al., 2011). Em raízes de *Arabidopsis* os polipeptídios de *NRT2.1* e *NAR2.1* interagem diretamente na membrana plasmática para constituir um oligômero que pode ser uma unidade funcional para um influxo de alta afinidade de NO_3^- (Yan et al., 2011). Entretanto *AtNAR2.1* não exerce papel na regulação da expressão de *AtNRT2.1*. Em *Arabidopsis* o transportador de NO_3^- *AtNRT2.1* não é corretamente endereçado a membrana plasmática, sendo as *AtNAR2s* indispensáveis para o endereçamento dos *NRT2s* a membrana plasmática, indicando que as proteínas NAR2 não funcionam como transportadores, mas sim representando um papel facilitador para o endereçamento de alguns *NRT2* a membrana plasmática (Guo et al., 2011).

Após absorvido pelo sistema radicular o nitrato pode ser armazenado no vacúolo das células radiculares, reduzido e assimilado nas raízes, ou enviado para a parte aérea, onde poderá ser reduzido e assimilado ou acumulado no vacúolo (Souza e Fernandes, 2006).

A redução do nitrato ocorre em duas etapas, inicialmente o NO_3^- é reduzido a nitrito, no citosol, pela ação da enzima NR (Xu et al., 2012). Para isso são utilizados dois elétrons provenientes do NADH ou NADPH, sendo que em plantas o NADH é o principal doador de elétrons para a NR, porém algumas plantas superiores como arroz, milho, cevada e soja, podem utilizar tanto o NADH quanto NADPH como doadores de elétrons para a NR (Souza et al., 2002). A atividade da NR pode ocorrer no citoplasma tanto das raízes como das folhas, sendo de uma forma geral mais alta nas folhas (Souza e Fernandes, 2006), e é regulada principalmente pelo NO_3^- , luz e CO_2 . Quando em condições de escuro ou baixa concentração de CO_2 a NR se torna inativa, isso se dá devido a uma fosforilação realizada por proteínas quinases em um resíduo de serina localizado entre as subunidades prostéticas MoCo e FAD (Souza et al., 2002).

O NO_3^- produzido pela NR é então reduzido a amônio (NH_4^+), pela ação da enzima NiR (Tobin & Bowsher, 2005). A reação ocorre por meio da transferência de seis elétrons da molécula de Ferredoxina reduzida (Fd_{red}) para o NO_3^- . A NiR é encontrada nos cloroplastos na parte aérea ou nos plastídios das células radiculares (Souza e Fernandes, 2006).

O amônio proveniente da redução do nitrato pela ação sequencial das enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, ou diretamente absorvido por transportadores específicos (AMTs) é assimilado em aminoácidos por meio da via GS/GOGAT (Xu et al., 2012). A primeira etapa na assimilação do amônio é realizada por meio de uma reação dependente de adenosina trifosfato (ATP), catalisado pela enzima glutamina sintetase (GS) (Lea & Mifflin, 2011). A enzima GS incorpora o NH_4^+ , produzindo glutamina, isso se dá pela ligação do NH_4^+ ao grupo carboxílico de uma molécula de glutamato, usando a energia fornecida pelo ATP (Souza e Fernandes, 2006). Existem duas isoformas de GS: uma citossólica (GS1) e uma localizada no cloroplasto (GS2) (Chardon et al., 2012). Nas folhas a principal isoforma é a GS2 que é essencial para reassimilar o amônio liberado pela fotorrespiração, já a isoforma GS1 é pouco abundante, sendo mais expressa nos tecidos vasculares, no caso do arroz nas células companheiras do floema, e é importante para a síntese de glutamina, a qual é a principal forma de nitrogênio transportada pelo floema (Ishiyama et al., 2004). Nas raízes a GS1 facilita a assimilação do amônio absorvido do solo ou originário da fixação biológica (Ishiyama et al., 2004). A proporção relativa em que as isoformas GS1 e GS2 são encontradas no tecido vegetal é influenciada por diversos fatores, dentre eles estágio de desenvolvimento e condições ambientais, tal como a luz (Souza e Fernandes, 2006).

A segunda etapa da assimilação do amônio é realizada pela enzima GOGAT, a qual transfere o grupo amino da glutamina para o 2-oxoglutarato (α -cetoglutarato), formando duas moléculas de glutamato (Ishiyama et al., 2004), uma irá regenerar o ciclo (via GS/GOGAT) e

a outra pode ser usada nas reações biossintéticas (Souza e Fernades, 2006). Existem duas isoformas da enzima GOGAT: uma dependente de NADH (NADH-GOGAT) e outra dependente de FADH (FADH-GOGAT) (Xu et al., 2012). A NADH-GOGAT é encontrada principalmente em tecidos não verdes, como por exemplo raízes, nódulos e cotilédones em desenvolvimento. Já a isoforma FADH-GOGAT é predominantemente encontrada nos cloroplastos, sendo a principal forma de glutamato sintase encontrada nas folhas verdes de arroz (Souza et al., 2002)

2.2 Metilação do DNA

A metilação do DNA e as modificações nas histonas se configuram nas denominadas alterações epigenéticas. Esse termo: *epigenética* tem sua origem no prefixo grego *epi* que significa “acima ou sobre algo”, e é um ramo da ciência que estuda as mudanças herdadas nas funções dos genes, as quais são observadas na genética, porém não alteram as sequências das bases nucleotídicas da molécula de DNA (Muller & Prado, 2008).

As modificações das histonas incluem a acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e outras. Uma forte acetilação das lisinas das histonas induz alterações na estrutura da cromatina ativando genes, assim como a deacetilação das histonas conduz a uma compactação das histonas e a repressão gênica (Zhao & Zhou, 2012). Entre as modificações que ocorrem nas histonas, a metilação é a que parece ter o papel mais importante na transmissão hereditária de informação epigenética durante a divisão celular (Qin et al., 2010).

A *metilação do DNA* ocorre preferencialmente nas citosinas (C), na posição 5 do anel (Figura 2). Em plantas a metilação do DNA pode chegar a mais de 50% das citosinas do genoma.

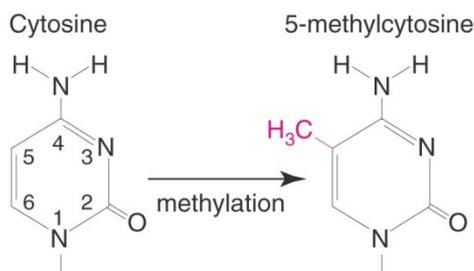


Figura 2. Metilação da citosina na posição 5 formando 5-metil citosina (Devlin, 2011)

A metilação da citosina em DNA de plantas é encontrada em três tipos de sequências: CG, CHG e CHH, em que H pode ser A, C ou T. Em função da natureza simétrica das metilações CG e CHG, elas podem ser simplesmente copiadas a cada replicação, o mesmo não acontece para CHH que precisa ser estabelecida *de novo* a cada replicação em função de sua natureza assimétrica (Mirouze & Paszkowski, 2011). A metilação do DNA pode ocorrer em elementos de transposição (transposons), no corpo ou na região promotora dos genes. A metilação no corpo do gene ou na região promotora ocorre principalmente nos dinucleotídeos CG, enquanto que a metilação nos transposons ocorre principalmente nas sequencias CHG ou CHH, como citado acima (Zhao & Zhou, 2012).

A metilação do DNA é feita por um grupo de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), as quais podem se dividir em três grupos: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. Elas catalisam a transferência do grupamento metil da S-adenosyl-L-metionina (doador de metil) para as bases de citosina ou adenina na molécula de DNA (Muller & Prado, 2008). O grupamento metil é transferido para o carbono 5 do resíduo de citosina originando 5-metilcitosina ou para o nitrogênio 6 da adenina, dando origem a N⁶-metiladenina. Em células eucarióticas a maioria das bases metiladas são citosinas, apenas algumas células,

principalmente de organismos unicelulares, apresentam baixos níveis de adenina metilada (Brero et al. 2006). Essas alterações no DNA (metilação e demetilação) são conhecidas como alterações epigenéticas, e a metilação do carbono 5 do resíduo de citosina é a principal alteração epigenética estudada em plantas e animais (Saze et al., 2012).

Em plantas, a enzima que catalisa a metilação nos dinucleotídeos CG é a Metiltransferase 1 (MET1), uma enzima homóloga da metiltransferase DNMT1 encontrada em mamíferos, enquanto a enzima Cromometilase 3 (CMT3), uma metiltransferase de DNA específica para plantas, catalisa a metilação dos sítios CHG (Saze et al., 2012; Mirouze & Paszkowski, 2011).

No que se trata de metilação CHH (não simétrica) é guiada por pequenos interferentes RNAs (siRNAs) em um processo de metilação direcionada por RNA (RdDM) (Mirouze & Paszkowski, 2011). O mecanismo molecular para RdDM envolve dois passos: o primeiro é a biogênese de siRNAs de 24 nucleotídeos e o segundo é a conversão dos sinais do siRNA em uma metilação *de novo* do DNA nas regiões alvo, e cada passo requer uma RNA polimerase dependente de DNA, abreviadas com Pol IV e Pol V, respectivamente (Saze et al., 2012).

Para a desmetilação do DNA há dois processos que podem ocorrer nas células: a demetilação passiva e a demetilação ativa. A demetilação passiva ocorre quando há uma inibição da atividade de manutenção durante a replicação do DNA ou quando a metiltransferase é impedida de interagir com seu substrato durante a divisão celular. Já na demetilação ativa ocorre uma perda de metilação do DNA por atividade enzimática na ausência de replicação do DNA. Há duas formas hipotéticas de como a metilação ativa pode ocorrer: uma que envolve a clivagem da ligação entre o resíduo metil e o anel da citosina, liberando o metil como um composto de monocarbono e regenerando a citosina com a adição de um hidrogênio na posição onde estava o grupamento metil, e a outra propõe um modelo que explicaria a perda da metilação pela retirada da citosina metilada por uma glicosilase, que pode também estar envolvida no reparo por excisão de bases do DNA (BER), a qual reconhece o resíduo de 5-metilcitosina e ataca a ligação glicosídica, removendo a base 5-metilcitosina. O sítio sem a base seria reparado por um mecanismo de reparo de bases do DNA, que é mediado por uma DNA polimerase desconhecida e uma DNA ligase (Gouveia, 2007; Saze et al. 2012).

As demetilases são enzimas que estão envolvidas em um dos processos de demetilação ativa, sendo as principais responsáveis pelo mesmo. A hipermetilação de um gene está relacionada com uma inibição regional de demetilases por proteínas que alteram a estrutura da cromatina, ou seja, a modificação na estrutura da cromatina pode definir os padrões de metilação do DNA, pela permissão do acesso de demetilases ao DNA metilado. Cromatina ativa recruta demetilases, enquanto cromatina inativa recruta DNMTs. Por isso mesmo na presença de demetilases ativas pode haver hipermetilação, pois na cromatina inativa, onde os genes estão hipermetilados, as demetilases não conseguem atuar (Gouveia, 2007).

Mecanismos epigenéticos podem influenciar na regulação transcricional e assim na expressão de genes, como, por exemplo, a metilação da citosina (C^m), trimetilação da lisina 27 (H3K27me3) e trimetilação da lisina 9 (H3K9me3) na histona 3 podem reprimir a expressão de genes, e ao contrário mono, di ou trimetilação da lisina 4 (H3K4me1/2/3), acetilação da lisina 27 (H3K27ac) e trimetilação na lisina 36 (H3K36me3) na histona 3 estão possivelmente associadas a transcrição dos genes (Xiao et al, 2012).

A metilação do DNA (Figura 1) é um tipo de marcação epigenética que influencia fortemente a estrutura da cromatina e expressão gênica em plantas e mamíferos, tendo uma função repressiva na atividade do promotor, podendo conduzir ao silenciamento da cromatina por duas maneiras: fisiologicamente impedindo a ligação dos fatores de transcrição ao promotor, ou recrutando proteínas as quais modificam as histonas ou remodelam a cromatina conduzindo a compactação da heterocromatina (Zhao e Zhou, 2012). A metilação do DNA

apresenta um importante papel na resposta da planta a estresses ambientais, como por exemplo, sob estresse hídrico ou por salinidade, regiões codificantes de certos genes podem ser demetiladas, fazendo com que esses genes sejam expressos (Wang et al., 2010).

Kou et al. (2011) constataram que quando sob estresse de N as plantas de arroz sofrem alterações nos seus padrões de metilação das citosinas, e que essas alterações são herdáveis. Wang et al. (2010), analisando plantas de arroz sob três condições (estresse hídrico, irrigadas e plantas que passaram por um período de estresse hídrico e tiveram um posterior suprimento de água), constataram que as condições de estresse alteraram os padrões de metilação/demetilação no genoma das plantas, sugerindo que este processo pode ser um mecanismo genético de adaptação das plantas ao estresse hídrico.

Analisando plantas de *Arabidopsis thaliana* sob tratamento com ácido jasmônico e salicílico, Latzel et al. (2012) constataram que as alterações epigenéticas por si só podem causar variações hereditáveis nas taxas de crescimento e na resposta das plantas aos hormônios de defesa e aos patógenos herbívoros.

Segundo Zhao & Zhou (2012), as modificações epigenéticas representam um papel importante na expressão de genes em arroz, por exemplo, a demetilação do DNA que é um dos principais mecanismos para a biogênese do endosperma de arroz.

A metilação do DNA ocorre normalmente em todos os organismos. Sob condições normais, em plantas, a taxa de citosinas metiladas em relação ao total de citosinas do genoma varia de 20 a 30 % (Wang et al., 2010). Análise de mapeamento do genoma de arroz para metilação da citosina mostrou que 31,2% dos genes ativos e 30,2% para genes preditos são metilados na região transcrita, 8,1% dos genes ativos são metilados na região promotora, e que há um aumento de metilação pericentromérica dos cromossomos (Yan et al., 2010).

2.3 Análise de Polimorfismo Amplificado Sensível a Metilação (MSAP)

Até os dias atuais foram desenvolvidas várias técnicas para estudar variações na metilação do DNA nuclear. Algumas técnicas se baseiam no uso de enzimas de restrição denominadas isoesquisômeros, que reconhecem o mesmo sítio de restrição, mas diferem quanto à sensibilidade a citosina metilada. Como exemplo de enzimas nessas técnicas a HpaII e a MspI, em que ambas reconhecem o sítio de restrição 5'-CCGG, porém a HpaII se torna inativa se uma das citosinas estiver metilada em ambas as fitas, enquanto que a MspI se torna inativa em sequências 5'-^mCCGG (Figura 3) (García et al, 2010).

A técnica de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados) é baseada na detecção de fragmentos genômicos de restrição por meio de amplificações por PCR e que pode ser usada para DNA de qualquer origem ou complexidade (Vos et al., 1995). Esta técnica permite a detecção de diversidade genômica sem qualquer conhecimento inicial da sequência de nucleotídeos por meio do uso de um par de enzimas de restrição (uma de corte frequente e outra de corte raro) com seus adaptadores correspondentes e combinados com seletivas reações de PCR (Xu et al., 2000).

A técnica de AFLP pode ser adaptada ao estudo de metilação do DNA, usando as enzimas denominadas isoesquisômero no lugar das enzimas de corte frequente, a essa técnica dá-se o nome de MSAP (*Methylation-sensitive amplication polymorphism*, Análise de Polimorfismo Amplificado Sensível a Metilação) (Xiong et al., 1998). Para isso duas PCRs sequenciais (uma de pré amplificação e outra seletiva) são realizadas após a restrição e ligação dos adaptadores para EcoRI e MspI/HpaII (Figura 4). São feitas duas análises, por exemplo, uma para EcoRI e MspI e outra para EcoRI e HpaII (García et al., 2010).

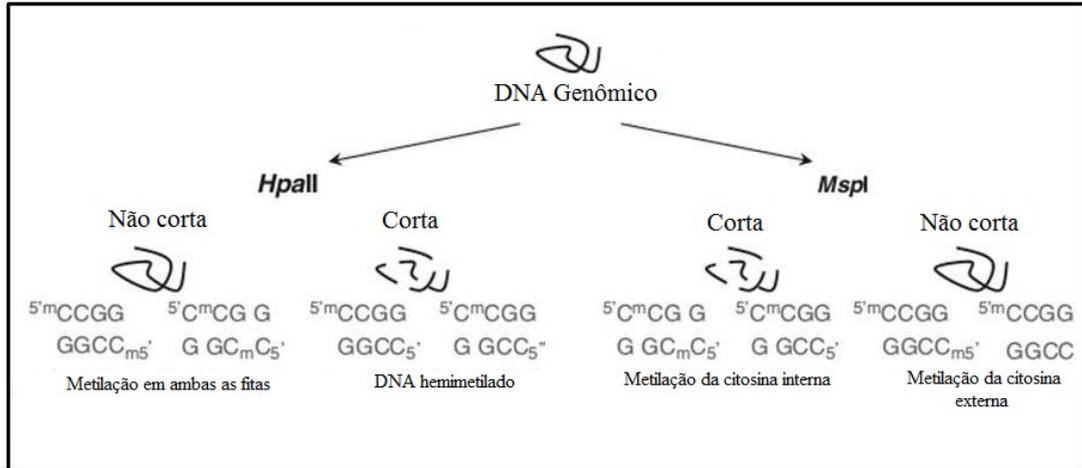


Figura 3. Esquema representando a ação das enzimas MspI e HpaII. Ambas as enzimas reconhecem o sítio de restrição 5'-CCGG, porém a HpaII se torna inativa se uma das citosinas estiver metilada em ambas as fitas, enquanto que a MspI se torna inativa em sequências 5'-^mCCGG. Adaptado de: García et al, 2010.

O primeiro passo da técnica MSAP é a digestão do DNA por meio da restrição com a dupla de enzimas EcoRI e MspI/HpaII gerando fragmentos de extremidade coesiva que serão ligados, em um segundo passo, a adaptadores de dupla fita, um para EcoRI e outro para MspI/HpaII, que servirão de moldes para as sucessivas PCRs. Em seguida são realizadas duas PCRs, uma PCR de pré-amplificação que pode conter uma ou nenhuma base seletiva e outra PCR seletiva que pode conter uma, duas ou três bases seletivas, utilizando *primers* correspondentes a sequência dos adaptadores, essas bases seletivas são para garantir que apenas um subconjunto de fragmentos serão amplificados em um nível detectável. E por último é feita a separação dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de poliácridamida desnaturante (Vuylsteke et al., 2007; Vos et al., 1995).

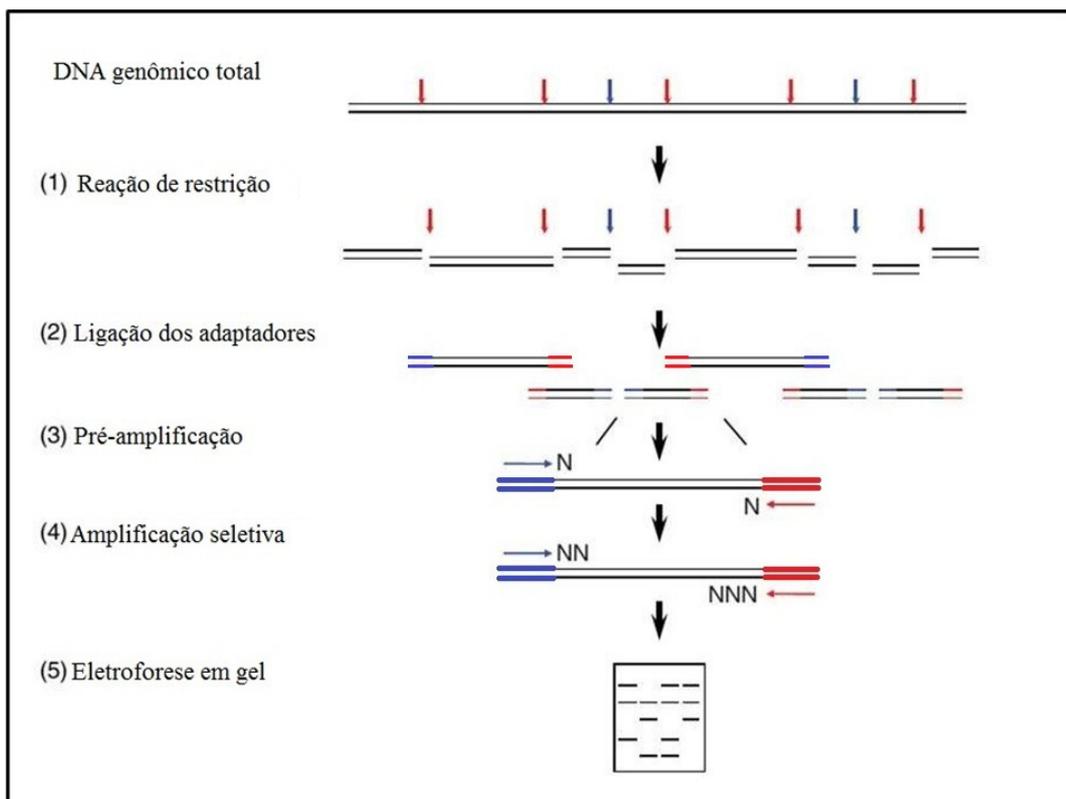


Figura 4. Esboço do procedimento da técnica de "Methylation-sensitive amplified polymorphisms" (MSAPs). (1) Fragmentos de DNA são gerados após a restrição com a dupla de enzimas EcoRI e MspI/HpaII (as setas em azul representam os sítios de reconhecimento para a enzima EcoRI e em vermelho para as enzimas MspI ou HpaII); (2) ligação dos adaptadores para EcoRI (em azul) e MspI ou HpaII (em vermelho) aos fragmentos de extremidade coesiva gerados após a restrição; (3) PCR de pré amplificação utilizando primers correspondentes a sequência dos adaptadores, podendo conter uma ou nenhuma base seletiva (N); (4) PCR seletiva utilizando os mesmos *primers* da PCR de pré amplificação, porém com uma, duas ou três bases seletivas (N) e (5) separação dos fragmentos gerados por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Adaptado de: Vuylsteke et al., (2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos, no qual o primeiro teve o intuito de dentre sete variedades de arroz, escolher quatro para as análises de MSAP, expressão dos transportadores e frações solúveis, que foram feitas no segundo experimento.

3.1 Seleção das Variedades

3.1.1 Cinética de absorção de N

Foram determinados os parâmetros cinéticos de absorção de nitrogênio nas variedades de arroz Cana roxa, IAC 47, Piauí, Três meses, Mira, Caiapó e Manteiga, escolhidas em função do teor de proteína no grão (com base em resultados obtidos em trabalhos realizados no Laboratório de Nutrição de Plantas da UFRRJ), do maior teor para o menor teor respectivamente, visando selecionar variedades a serem utilizadas nos experimentos para avaliação da metilação do DNA, expressão dos transportadores de N e frações solúveis descritos nos itens 3.5, 3.7 e 3.8. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições.

As sementes de arroz foram desinfestadas em uma solução de hipoclorito a 2% por 20 minutos sob agitação e em seguida foram lavadas dez vezes com água destilada. Depois de desinfestadas, as sementes foram colocadas para germinar na superfície de uma lâmina d'água de um vaso de 700 mL, sustentadas por gaze. As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12horas/12horas (luz/escuro), fluxo de fótons fotossintéticos de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, umidade relativa do ar de 70% e temperatura de 28°C/24°C (diurna/noturna).

As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland e Arnom (1950) com 1/8 de força iônica contendo 0,5 mM de N-NO_3^- e 0,1 mM de N-NH_4^+ até o sexto dia após a germinação (DAG). Entre o sexto e o nono DAG foi fornecido uma solução de 1/4 de força iônica e 2 mM de N-NO_3^- e 0,1 mM de N-NH_4^+ . Após o nono DAG as plantas foram separadas em dois grupos em que 1/3 das plantas receberam uma solução a 1/2 de força iônica contendo 2 mM de N-NO_3^- até os 16 DAG, e após o 16 DAG receberam uma solução de 1/2 de força iônica e 0,2 mM de N-NO_3^- até o 25 DAG (tratamento 0,2 mmol L^{-1} constante), o outro grupo composto por 2/3 das plantas receberam uma solução a 1/2 força iônica contendo 2 mM de N-NO_3^- até os 22 DAG, após o 22 DAG as plantas passaram por um período de 72 horas sem N (receberam solução de 1/2 de força iônica sem N) e em seguida divididas em dois grupos: um grupo recebeu ressuprimento com uma solução a 1/2 de força iônica contendo 0,2 mM de N-NO_3^- (tratamento 0,2 mM resuprimento), outro grupo recebeu uma solução a 1/2 força iônica contendo 2mM de N-NO_3^- (tratamento 2 mM resuprimento) (Figura 5). Todas as plantas a partir dos 15 DAG não receberam mais N-NH_4^+ .

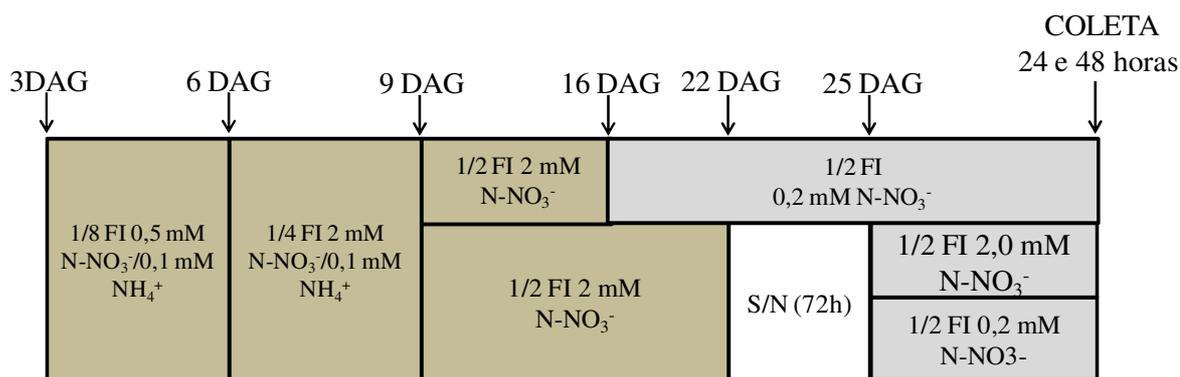


Figura 5. Esquema experimental utilizando plantas das variedades arroz IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa. As coletas foram realizadas no 22º DAG para determinação dos parâmetros cinéticos de absorção ($V_{máx}$ e K_m).

No 25º DAG após a troca de solução (às 6 horas da manhã) foram coletadas amostras de solução a cada meia hora, durante as cinco primeiras horas e depois a cada uma hora até a coleta para o grupo com $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ e a cada uma hora até a coleta para o grupo com 2 mM de $\text{N} - \text{NO}_3^-$. As amostras de solução nutritiva foram coletadas das 7 às 20 horas durante dois dias consecutivos. As amostras foram utilizadas para a determinação colorimétrica de nitrato de acordo com Cataldo et al. (1975) (para 2 mM de $\text{N} - \text{NO}_3^-$) e Miranda et al. (2001) (para $0,2 \text{ mM}$ de $\text{N} - \text{NO}_3^-$, modificado de acordo com o item 6.2). O método de Miranda et al. (2001) foi empregado por apresentar uma maior eficiência de quantificação quando o NO_3^- se encontra em baixas concentrações, porém o mesmo não quantifica em concentrações superiores a $0,250 \text{ mM}$, por isso para a concentração de 2 mM foi empregado o método proposto por Cataldo et al. (1975). Empregou-se o processo gráfico-matemático proposto por Ruiz (1985) para calcular os valores de $V_{máx}$ e K_M , baseado no programa “Cinética” (Ruiz e Fernandes Filho, 1992), de acordo com o método de Claassen e Barber (1974). Após o término das coletas de solução nutritiva as plantas foram coletadas, secas em estufa de circulação forçada a $72 \text{ }^\circ\text{C}$ por dois dias e determinada a massa seca de raiz, parte aérea e relação raiz/parte aérea.

3.1.2 Determinação do teor de $\text{N} - \text{NO}_3^-$ em solução nutritiva (modificação do protocolo de Miranda et al., 2001)

Para uma maior precisão na determinação de nitrato a partir de soluções com baixas concentrações foi utilizado o protocolo proposto por Miranda et al. (2001), sendo necessários ajustes pois o protocolo foi inicialmente proposto para a determinação simultânea de nitrato e nitrito em plasma sanguíneo. A técnica é baseada na redução de nitrato a nitrito pelo cloreto de vanádio III (VCL_3), combinado com a detecção por meio da reação de Griess.

Foram realizados vários testes (dentre eles testes alterando a concentração dos reagentes, das amostras, etc) até que os devidos ajustes foram feitos para uma melhor eficiência na determinação de nitrato em solução nutritiva. Em uma microplaca de 96 poços, são pipetados $30 \mu\text{L}$ da amostra de solução nutritiva e $60 \mu\text{L}$ de uma solução resultante da mistura de VCL_3 $0,5\%$ (m/v) em HCl 1M + sulfanilamida $0,4\%$ (m/v) em HCl 1M + N-(1-naftil) etilenodiamnino dihidroclorido ($0,02\%$ (m/v) em H_2O ultrapura), na proporção de 2:1:1. Em seguida as amostras foram colocadas em estufa a 40°C por 50 minutos para acelerar desenvolvimento da cor, e após o aquecimento foram adicionados $110 \mu\text{L}$ de H_2O ultrapura e procedendo a leitura a 540nm .

3.2 Análises de MSAP, Expressão dos Transportadores e Frações Solúveis

3.2.1 Cultivo das variedades selecionadas de arroz para análises de polimorfismo amplificado sensível a metilação, expressão gênica dos transportadores de nitrato e frações solúveis

As variedades utilizadas nesse experimento IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, foram escolhidas com base no experimento de cinética de absorção de N-NO_3^- (ver item 6.1). As plantas foram submetidas a dois tratamentos: suprimento normal de nitrogênio (2 mM de N-NO_3^-) e baixo suprimento (0,2 mM de N-NO_3^-) (Figura 6). As plantas foram cultivadas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro) radiação aproximada de $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (fluxo de fótons fotossintéticos), umidade relativa do ar de 70% e temperatura de $28^\circ\text{C}/24^\circ\text{C}$ (diurna/noturna). Todas as plantas foram colhidas, metade das amostras de raízes foram utilizadas para as análises de polimorfismo amplificado sensível a metilação de acordo com o protocolo de García et al. (2010), expressão gênica dos transportadores de nitrato, e outra metade para as análises das frações solúveis. Na parte aérea todas as amostras foram utilizadas apenas para as análises das frações solúveis. As amostras vegetais foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até a extração de DNA e RNA total.

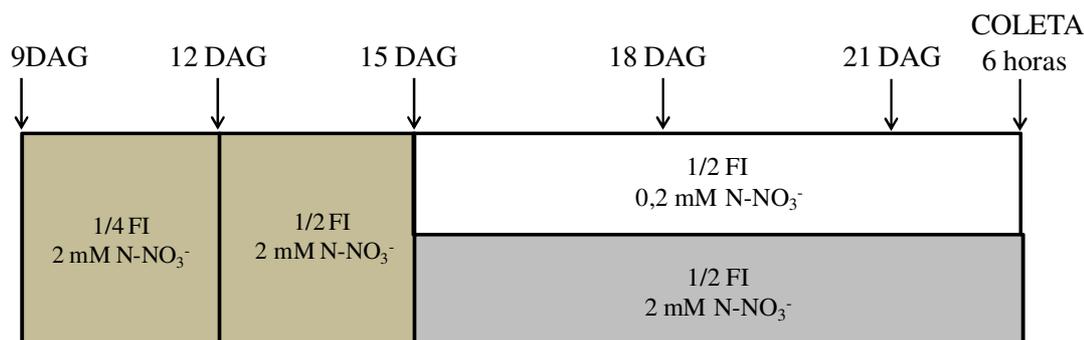


Figura 6. Esquema do experimento para avaliação do perfil de metilação em plantas de arroz cultivadas sob dois níveis de N-NO_3^- . DAG: dias após germinação, FI: força iônica. Baixo suprimento de N (0,2 mM N-NO_3^-), Suprimento normal de N (2 mM N-NO_3^-).

3.2.2 Extração de DNA e RNA

A extração de DNA para a análise de polimorfismo amplificado sensível a metilação (MSAP) e de RNA para a análise da expressão de transportadores foi realizada simultaneamente utilizando a metodologia proposta por Gao et al. (2001) com modificações. Amostras de raízes foram maceradas em N_2 líquido e homogeneizadas em uma mistura contendo 800 μL de tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS), 600 μL de solução fenol:clorofórmio (1:1) e agitadas por 5-10 minutos. Após centrifugação a $18.000\times g$ por 20 minutos a 4°C o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA e RNA foram precipitados pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 2 M pH 4,8 ($\text{NaOAc}_{\text{DEPC}}$) e 1 volume de isopropanol puro gelado. A seguir a mistura foi mantida a -80°C por 1 hora seguida de centrifugação a $18.000\times g$ por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 500 μL de etanol_{DEPC} 70% gelado seguido de centrifugação a $18000\times g$ por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi solubilizado em 500 μL de $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ e o RNA foi precipitado de forma seletiva pela adição de 500 μL de cloreto de lítio 4 M pH 4,8 ($\text{LiCl}_{\text{DEPC}}$). As amostras foram mantidas em gelo e na

geladeira por uma noite e a seguir centrifugadas a 18.000xg por 20 minutos. O sobrenadante, contendo DNA, foi transferido para um novo tubo de 2 mL para a precipitação do DNA pela adição de 1/10 volume de acetato de sódio 2 M pH 4,8 (NaOAc_{DEPC}) e 1 volume de isopropanol puro gelado, armazenado a -80°C por uma noite, em seguida centrifugado a 18000xg por 20 minutos, e o precipitado foi dissolvido em 450 µL de H₂O_{DEPC}, 50 µL de NaOAc_{DEPC} e 800 µL de etanol absoluto gelado, precipitado a -80 °C por 30 minutos e em seguida centrifugado a 18.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante (após precipitação do DNA e RNA) foi descartado e o precipitado lavado com 500 µL etanol 70% gelado e em seguida centrifugados a 18000xg por 10 minutos. O etanol foi retirado com o auxílio de uma pipeta semi-automática para não desfazer o precipitado e os tubos mantidos abertos no gelo para a evaporação total de etanol por aproximadamente 10 minutos. O precipitado foi dissolvido em 40 µL de H₂O DEPC e armazenados a - 80° C. A qualidade do DNA extraído foi verificada em espectrofotômetro por meio das relações A₂₆₀/A₂₃₀e A₂₆₀/A₂₈₀ e visualização em gel de agarose (1%) com GelRedTM (Biotium).

3.2.3 Análise de polimorfismo amplificado sensível a metilação (MSAP)

O DNA genômico das amostras coletadas foi digerido em dois passos usando a dupla de enzimas EcoRI/ MspI e EcoRI/ HpaII de acordo com o protocolo de García et al. (2010) com algumas alterações. Inicialmente 500 ng de DNA foi incubado em um volume final de 35 µL, com 6U de MspI, 10U EcoRI, 1x tampão B (Promega) e 1x BSA a 37°C por uma noite. Pelo fato da enzima HpaII ter uma baixa eficiência de restrição com o tampão B, a digestão com EcoRI/ HpaII foi feita separada da seguinte forma: 500 ng de DNA foi incubado em um volume final de 25 µL com 6U de HpaII, 1x tampão A (Promega), 1x BSA a 37°C por 3 horas. Após a digestão com HpaII a DNA foi precipitado por meio da adição de 0,1 volume de acetato de sódio (NaOAc 3 M, pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol puro e incubado a -20°C por 1 hora. Após a precipitação a amostra foi centrifugada a 18000g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados abertos por 3 minutos a temperatura ambiente para a completa eliminação do etanol, e o pellet ressuscitado em 24 µL de H₂O_{DEPC}. O DNA ressuscitado foi digerido com 10U EcoRI em um volume final de 35 µL com 1x tampão H (Promega) e 1x BSA a 37°C por 3 horas. Foi retirada uma alíquota de 4 µL para verificar a eficiência da restrição por meio de um gel de agarose 1,5%. O DNA digerido foi ligado a dois diferentes adaptadores, um para a extremidade coesiva formada pela restrição com EcoRI e outro formado pela restrição com MspI/HpaII. Os adaptadores foram ligados aos fragmentos de DNA por meio da adição aos 31 µL de reação de restrição restante, 9 µL de um mix contendo 5 pmol de adaptador EcoRI, 50 pmol de adaptador MspI/HpaII, 1x tampão T4 ligase e 1,2U de T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 4°C por uma noite. O produto resultante foi diluído 20 vezes (reação com EcoRI/ HpaII) ou 30 vezes (reação com EcoRI/ MspI) e usado para pré-amplificação. O volume total utilizado na pré-amplificação foi de 20 µL, contendo 3 µL da mistura diluída mencionada acima, 1x tampão PCR, 0,4 µL de dNTP 10mM, 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM, 30 ng de primer EcoRI, 30 ng primer H/M, 0,4U de taq DNA polimerase. A reação de PCR foi realizada em 20 ciclos consistindo de 30 segundos a 94°C, 1minuto de anelamento a 56°C e 1minuto de extensão a 72°C. Os produtos pré-amplificados foram visualizados por meio de um gel de agarose 0,8%. Os produtos amplificados foram diluídos 20 vezes (reação com EcoRI/ HpaII) ou 10 vezes (reação com EcoRI/ MspI) e usados para uma segunda amplificação seletiva com os mesmos *primers*, mas contendo dois nucleotídeos seletivos na extremidade 3'. A amplificação seletiva foi realizada em um volume total de 20 µL, contendo 5 µL da mistura diluída mencionada acima, 1x tampão PCR, 0,2 µL de dNTP 10 mM, 0,6 µL de MgCl₂ 50 mM, 12 ng de *primer* EcoRI, 30 ng *primer* H/M, 0,4U de taq DNA polimerase. A PCR foi realizada usando parâmetros

clássicos de AFLP: 12 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 65°C - 56°C (*touch-down*, ou seja, a temperatura decresce 0,7°C a cada ciclo) e 1 minuto de extensão a 72°C, seguido de 32 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos de anelamento a 56°C e 1 minuto de extensão a 72°C. O produto final da amplificação foi desnaturado e separado em gel de poliacrilamida a 6% e visualizado por coloração com prata.

3.2.4 Síntese de cDNA

Amostras de 0,5 µg de RNA total foram tratadas com DNase I (Sigma-Aldrich) seguindo as recomendações do fabricante e a síntese de cDNA realizada com o kit “*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.5 Reações de PCR em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, de acordo com as recomendações do fabricante: 2 µL da mistura de *primers forward + reverse* (3,6 µM cada); 4 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) e 2 µL da reação de síntese de cDNA diluída 1:10. A mistura foi agitada por 2 minutos em agitador de placas, centrifugada a 4000 rpm por 4 minutos e levada para o aparelho de PCR em tempo real “*Step One Plus Real Time PCR System*” (Applied Biosystems). Os primers para os genes estudados que codificam os transportadores de nitrato foram desenhados utilizando-se o programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems) (Tabela 1).

Os genes da Actina 2 e Ubquitina 5 de arroz foram utilizados como de referencia para normalização da expressão gênica. A expressão gênica foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak e Schmittgen, 2001). Como controle foi utilizada a variedade IAC 47 no tratamento de 2 mM, a qual recebeu o valor de expressão igual a 1.

Tabela 1: Sequências dos *primers* (iniciadores) *forward* e *reverse* usados nas reações de PCR em tempo real para os genes de três transportadores de nitrato de alta afinidade (*OsNRT2.1* a *2.3*), três transportadores de nitrato de baixa afinidade (*OsNRT1.1*, *1.2* e *1.4*), proteína NAR (*OsNAR2.1* e *2.2*) e os genes de referencia Actina (*OsAct2*) e Ubiquitina 5 (*UBQ5*) de arroz e números de acesso no banco de dados do NCBI.

Gene	Nº acesso	Primer Forward	Primer Reverse
<i>OsNRT2.1</i>	NM_001052193.1	5'-CGCCGCAACGTCATCAA-3'	5'-GCGTGTTATCATCGAGTCGAACT-3'
<i>OsNRT2.2</i>	NM_001052194.1	5'-CGCCGCAACGTCATCAA-3'	5'-AAACGGTAACAAAACGTTCAACAG-3'
<i>OsNRT2.3</i>	NM_001050538.1	5'-ACGGAGACCGGGATCAAGTA-3'	5'-CCCCTGCGGGAAGTAGATG-3'
<i>OsNRT1.1</i>	NM_001067555.1	5'-CGAGGTTGGTGCATTTTGTG-3'	5'-GCCGTGGTGTCTCTTTTTTTTT-3'
<i>OsNRT1.2</i>	NM_001064472.1	5'-CAATCTGTAATGCAGGGTTAACTGTT-3'	5'-AGCATCCTCAAGACCACCAAA-3'
<i>OsNRT1.4</i>	NM_001074096.1	5'-AATGATCCCTGATTAGGTCAAGTCA-3'	5'-CCAAATACCACTACTCTTGATCCT-3'
<i>OsNAR2.1</i>	NM_001053852.2	5'-AAGACGCAGGTGTTCTCTCC-3'	5'-ACTTCACCGTGCTTGGGC-3'
<i>OSNAR2.2</i>	NM_001059634.1	5'-ACGATCATGGCTCGGTTTG-3'	5'-CAAGCACCGAGAACTACAAGGA-3'
<i>OsACT2</i>	NM_001057621.1	5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA-3'	5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA-3'
<i>OsUBC5</i>	AK061988	5'-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3'	5'-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3'

3.2.6 Análises das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Amostras de material coletado foram homogeneizadas em etanol 80%, trituradas e filtradas com a auxílio de papel filtro e gaze, e após partição com clorofórmio (Fernandes, 1984) a fração solúvel obtida foi utilizada para a determinação dos teores de N-amino livre (Yemm & Cocking, 1955), N-NO₃⁻ (Cataldo et al., 1975), N-NH₄⁺ (Felker, 1977) e açúcares solúveis (Yemm & Willis, 1957). Também foi realizada a análise de N total (Tedesco, 1983) a partir de material seco em estufa até obtenção do peso constante. Para a obtenção dos valores de N total reduzido foi realizada a soma dos valores de N- NH₄⁺, N- amino e N total.

3.2.7 Análise estatística

A presença e ausência das bandas no gel foram determinadas por meio de inspeção visual e foram marcadas como 0 (ausência) e 1 (presença), tanto para EcoR-I/Msp-I como para EcoR-I/Hpa-II. As mudanças de metilação na citosina foram divididas em dois grupos, CG e CHG como descrito por Yu et al. (2013). Hpa-II e Msp-I são dois isoesquisômeros que reconhecem o mesmo sítio de restrição (5'-CCGG) mas diferem quanto à sensibilidade em relação a quais citosinas foram metiladas. A HpaII não consegue clivar se qualquer uma das citosinas estiver metilada em ambas as fitas, enquanto que a MspI não cliva se a citosina externa estiver metilada. Assim, os tipos de metilação na citosina podem ser distinguidos nos perfis de EcoRI+HpaII/MspI por meio da técnica de MSAP. Dessa forma, a metilação é definida como CG se a banda estiver presente na digestão com MspI e ausente na digestão com HpaII, e metilação CHG quando a banda estiver presente na digestão com HpaII e ausente na digestão com MspI. As bandas que aparecem em ambas as digestões são consideradas provenientes de regiões não metiladas.

As porcentagens de metilação para os dois grupos de metilação foram calculadas e as associações entre os tipos de metilação a as doses de N-NO₃⁻ foram verificadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) ao nível de 0,5% de significância. Foi construída uma matriz binária para cada tratamento e a similaridade genética foi estimada por meio do coeficiente de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1908), e para a geração dos dendrogramas foram testados quatro métodos de agrupamento: Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward, sendo escolhido em função do maior valor de coeficiente de correlação cofenética (Sokal & Rohlf, 1962), utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2011).

Os dados obtidos das frações nitrogenadas, açúcares solúveis e cinética de absorção de N-NO₃⁻ foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias analisadas pelo teste de Tukey (p<0,05), utilizando o programa computacional Sistema para Análise de Variância - SISVAR (Ferreira, 2000).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cinética de Absorção de N- NO₃⁻

As plantas cultivadas constantemente com 0,2 mM de N-NO₃⁻, esgotaram o nitrato da solução nutritiva após 6h, uma hora a mais que as plantas submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM após permanecerem 72 horas sem N. Quando submetidas ao ressuprimento com 2 mM, o N-NO₃⁻ em solução esgotou 30 horas após o início do experimento.

Observa-se que no tratamento com 0,2 mM constante as variedades Piauí e a IAC 47 apresentaram maior massa seca de raiz (Tabela 2). O mesmo acontece para os ressuprimentos com 0,2 e 2 mM constante. Já a variedade Três Meses apresentou a menor massa seca de raiz nos tratamentos sob ressuprimento com 0,2 mM e cultivo com 2 mM constante. As variedades Três Meses e Cana roxa não apresentaram diferenças significativas entre os três tratamentos, indicando que as raízes dessas variedades se desenvolveram de modo similar independente da concentração de nitrato na solução. De um modo geral, no que se trata de sistema radicular, as plantas respondem de forma diferente à concentração de nitrogênio no meio, e essa capacidade diferenciada das variedades em desenvolver o sistema radicular pode estar relacionado a uma habilidade adaptativa para absorver nutrientes com maior eficiência, tendo em vista que sistemas radiculares mais desenvolvidos exploram melhor o solo, facilitando a absorção de nutrientes (Mengel & Barber, 1974).

Tabela 2. Massa seca de raiz (g/vaso) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com N-NO₃⁻: 0,2 mM constante e ressuprimento com 0,2 mM e 2 mM após 72 h em solução sem NO₃⁻.

Variedades	Massa seca de raiz (g/vaso)					
	Tratamentos com N-Nitrato (mM)					
	Constante		Ressuprimento			
	0,2 mM		0,2 mM		2 mM	
IAC 47	0,45	Ab	0,49	Ab	0,58	Aa
Piauí	0,41	ABb	0,45	ABab	0,51	ABa
Manteiga	0,35	Bb	0,37	BCb	0,47	BCa
Três meses	0,34	Ba	0,34	Ca	0,36	Da
Caiapó	0,33	Bb	0,38	BCab	0,42	CDa
Mira	0,35	Bb	0,38	BCb	0,48	BCa
Cana Roxa	0,33	Ba	0,38	BCa	0,40	CDa

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05).

No tratamento sob cultivo constante com 0,2 mM de nitrato, não houve diferença significativa entre as variedades, entretanto, para os tratamentos 0,2 mM ressuprimento e 2 mM constante, a variedade IAC 47 apresentou um maior massa seca de parte aérea, diferindo estatisticamente das demais (Tabela 3). As variedades IAC 47, Manteiga e Mira apresentaram um menor massa seca de parte aérea quando cultivada no tratamento sob cultivo constante com 0,2 mM de nitrato, quando comparado aos tratamentos 0,2 mM ressuprimento e 2 mM constante. Todas as variedades apresentaram menor massa seca de parte aérea no tratamento com 0,2 mM constante quando comparado aos demais tratamentos, indicando que o cultivo

sob baixo suprimento de N durante o período de seis dias prejudicou o crescimento da parte aérea dessas plantas.

Tabela 3. Massa seca de parte aérea (g/vaso) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa, cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com N-NO₃⁻: 0,2 mM constante e ressuprimento com 0,2 mM e 2 mM após 72 h em solução sem N.

Massa seca de parte aérea (g/vaso)			
Variedades	Tratamentos com N-Nitrato (mM)		
	Constante	Ressuprimento	
	0,2 mM	0,2 mM	2 mM
IAC 47	0,78* Ac	1,19 Ab	1,45 Aa
Piauí	0,63 Ab	1,02 ABa	1,19 Ba
Manteiga	0,61 Ac	0,84 Bb	1,09 Ba
Três meses	0,61 Ab	0,92 Ba	1,02 Ba
Caiapó	0,57 Ab	0,90 Ba	1,05 Ba
Mira	0,60 Ac	0,86 Bb	1,13 Ba
Cana Roxa	0,56 Ab	0,90 Ba	1,03 Ba

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05).

A variedade Piauí apresentou maior razão raiz/parte aérea no tratamento com 0,2 mM constante, diferindo significativamente das demais (Tabela 4). Nos tratamentos 0,2 mM ressuprimento e 2 mM constante, a variedade Três Meses apresentou a menor relação raiz/parte aérea comparada com as demais variedades. Uma maior razão raiz/parte aérea pode estar relacionada com um maior crescimento radicular, isso se dá pelo fato de que sob baixa disponibilidade de nutriente, as plantas investem no sistema radicular, como estratégia de aumentar a absorção de nutrientes, pois um aumento no sistema radicular implica em uma maior exploração do solo pelas plantas (Clarkson, 1985).

Tabela 4. Relação raiz/parte (g/vaso) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com N-NO₃⁻: 0,2 mM constante, e ressuprimento com 0,2 mM e 2 mM após 72 h em solução sem N.

Relação raiz/parte aérea (g/vaso)			
Variedades	Tratamentos com N-Nitrato (mM)		
	Constante	Ressuprimento	
	0,2 mM	0,2 mM	2 mM
IAC 47	0,58* Ba	0,41 ABb	0,40 Ab
Piauí	0,66 Aa	0,44 Ab	0,43 Ab
Manteiga	0,58 Ba	0,44 Ab	0,43 Ab
Três meses	0,57 Ba	0,37 Bb	0,36 Bb
Caiapó	0,58 Ba	0,42 Ab	0,40 ABb
Mira	0,58 Ba	0,45 Ab	0,42 Ab
Cana Roxa	0,60 Ba	0,42 Ab	0,39 ABb

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05).

Analisando os parâmetros cinéticos de absorção de nitrato ($V_{Máx}$ e K_M) (Tabela 5) as variedades foram divididas em dois grupos: grupo 1, no qual não foi constatado diferença significativa para o parâmetro cinético K_M entre os tratamentos 0,2 mM constante e resuprimento com 0,2 mM e grupo 2 no qual foi constatado diferença significativa para o parâmetro cinético K_M entre os tratamentos 0,2 mM constante e resuprimento com 0,2 mM (Figura 7). Na nutrição de plantas, o K_M é uma medida de afinidade do sistema transportador (neste caso, na raiz), pelo íon a ser transportado, de modo que quanto menor o K_M , maior a afinidade do sistema pelo íon a ser transportado (Fernandes e Souza, 2006). Desta forma podemos observar que para o grupo 2, quando submetidas ao tratamento 0,2 mM constante, as plantas de arroz apresentaram uma maior afinidade pelo NO_3^- . Isso pode estar relacionado a uma adaptação dessas variedades a baixa disponibilidade de NO_3^- , ou seja, ao passar por períodos mais prolongados sob baixa disponibilidade deste nutriente, essas variedades utilizaram de mecanismos os quais favoreceriam uma maior absorção do mesmo, como por exemplo, investir em transportadores de alta afinidade.

Tabela 5. Parâmetros cinéticos ($V_{máx}$ e K_M) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os três tratamentos com $N-NO_3^-$: 0,2 mM constante, 0,2 mM ressuprimento após 72 h de deficiência.

Variedade	V_{Max} ($\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ massa fresca)		K_M ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
	0,2 mM const	0,2 mM resu	0,2 mM const	0,2 mM resu
IAC 47	51,60 [*] Aa	52,58 Aa	16,79 Aa	12,95 Ba
Piauí	48,65 Aa	55,75 Aa	11,54 Ab	26,96 Aa
Manteiga	52,69 Aa	52,26 Aa	15,21 Aa	12,17 Ba
Três meses	51,95 Aa	59,95 Aa	15,78 Aa	13,63 Ba
Caiapó	59,83 Aa	60,66 Aa	14,50 Ab	35,69 Aa
Mira	57,41 Aa	57,73 Aa	11,69 Ab	33,80 Aa
Cana Roxa	53,94 Aa	58,74 Aa	13,91 Ab	29,76 Aa

*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças significativas para a $V_{máx}$ tanto entre as variedades como entre os tratamentos (0,2 mM constante e ressuprimento com 0,2 mM resuprimento e 0,2 mM constante). O mesmo ocorre para o ressuprimento com 2 mM, onde não houve diferenças significativas para os dois parâmetros analisados (Tabela 6).

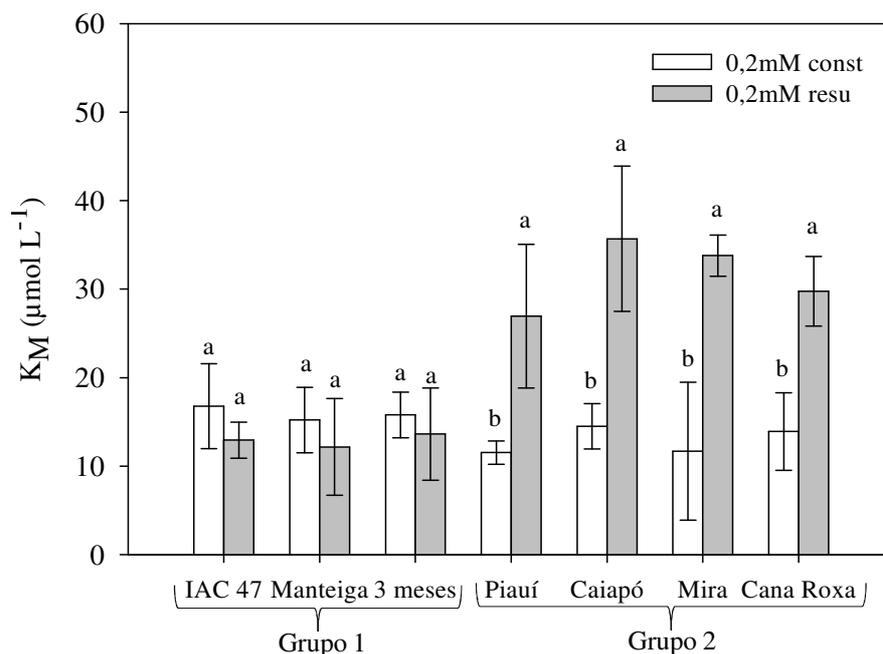


Figura 7. Km das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa submetidas aos tratamentos: 0,2 mM constante e ressuprimento com 0,2 mM, divididas em dois grupos: grupo 1, não houve diferença significativa e grupo 2 houve diferença significativa para o parâmetro cinético Km entre os dois tratamentos.

Tabela 6. Parâmetros cinéticos (V_{max} e K_M) das plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó, Três meses, Mira, Manteiga e Cana roxa cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução com ressuprimento de 2 mM $N-NO_3^-$ após 72 h em solução sem N.

Variedade	2 mM Ressu	
	V_{max}	K_M
IAC 47	110,08* a	414,19 a
Piauí	89,30 a	438,66 a
Manteiga	115,58 a	339,11 a
Três meses	113,94 a	312,55 a
Caiapó	118,98 a	497,96 a
Mira	91,62 a	303,98 a
Cana Roxa	106,13 a	379,76 a

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

4.2 Análises de MSAP, Expressão dos Transportadores e Frações Solúveis

4.2.1 Seleção das variedades

Com base nos resultados do experimento I foram selecionadas quatro variedades: IAC 47, Manteiga, Piauí e Caiapó, para as análises de Polimorfismo Amplificado Sensível a Metilação (MSAP), expressão de transportadores de $N-NO_3^-$ e frações solúveis.

As variedades foram divididas em dois grupos de acordo com o valor de K_M no tratamento onde as plantas foram submetidas ao ressuprimento com 0,2 mM de $N-NO_3^-$ (Figura 7), sendo selecionadas duas variedades de cada grupo. As variedades Piauí e IAC 47 foram escolhidas em função do grande volume de informações já obtidas pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Nutrição de plantas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Para o grupo 1 além da variedade IAC 47 foi escolhida a variedade Manteiga em função dos resultados encontrados e descritos acima: maior massa seca de raiz e menor K_M quando cultivada constantemente sob baixo suprimento de N em relação a variedade Três meses pertencente ao mesmo grupo.

Para o grupo 2 além da variedade Piauí foi selecionada a variedade Caiapó. Neste grupo as variedades Caiapó e Mira tiveram redução no K_M quando comparando os tratamentos 0,2 mM ressuprimento e 0,2 mM constante. No entanto, a variedade Caiapó apresentou um menor massa seca de raiz e parte aérea nos tratamentos 0,2 mM constante e ressuprimento com 2 mM, e uma menor relação raiz/parte aérea nos tratamentos 0,2 mM resuprimento e 2 mM ressuprimento embora não houve diferenças significativas entre ambas.

4.2.2 Parâmetros morfológicos

Não houve diferenças entre as variedades nos para massa fresca de raiz e relação/raiz parte aérea (Tabela 7). No entanto, para massa fresca de parte aérea, tanto no tratamento de 0,2 mM quanto 2 mM constante a variedade IAC 47 apresentou os maiores valores, diferindo significativamente das demais. Shi et al. (2010) definiram EUN como sendo a relação entre a produção de grãos e N fornecido, sendo dividida em duas partes: eficiência de absorção de N e eficiência fisiológica de uso de N. No estágio de plântulas a eficiência fisiológica de uso foi considerada como acúmulo de biomassa por N acumulado. Foi constatado que plântulas de arroz com maior EUN apresentaram maior massa seca de raiz e folha em baixa disponibilidade de N na fase de plântula há uma competição inter e intraespecífica, nessa condição plantas maiores (maior biomassa) tem uma maior probabilidade de ganhar a competição, porém além da biomassa vegetal a produção de grãos é formada por muitos outros fatores (Zhang et al., 2010).

Tabela 7. Massa fresca de raiz e parte aérea, relação raiz/ parte aérea das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

	Caiapó	IAC 47	Manteiga	Piauí
Massa fresca de raiz (g/2 plantas)				
0,2 mM const	0,43 Ba	0,66 Aa	0,52 ABa	0,52 Aba
2 mM const	0,42 Ba	0,70 Aa	0,40 Ba	0,48 Ba
Massa fresca de parte aérea (g/2 plantas)				
0,2 mM const	0,63 Ba	0,94 Ab	0,57 Ba	0,62 Bb
2 mM const	0,57 Ca	1,09 Aa	0,59 Ca	0,77 Ba
Relação raiz/parte aérea				
0,2 mM const	0,68 Aa	0,71 Aa	0,91 Aa	0,83 Aa
2 mM const	0,76 Aa	0,64 Aa	0,68 Ab	0,62 Ab

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$).

Comparando os dois tratamentos (0,2 e 2 mM constante) as variedades IAC 47 e Piauí apresentaram os maiores valores de massa fresca de parte aérea no tratamento com 2 mM, indicando que na presença de N essas variedades investem no crescimento de parte aérea. Por outro lado as variedades Caiapó e Manteiga não apresentaram diferenças significativa entre os dois tratamentos.

As variedades Manteiga e Piauí apresentaram os maiores valores de razão raiz/parte aérea no tratamento com 0,2 mM constante. Esse comportamento se deu provavelmente devido ao aumento (embora não significativo) na massa fresca de raiz pela variedade Manteiga no tratamento com 0,2 mM e ao aumento na massa fresca de parte aérea pela variedade Piauí no tratamento com 2 mM. Plantas de *Arabidopsis* apresentaram aumento na relação raiz/parte a medida que houve decréscimo da concentração de NO_3^- no meio de 10 até 0,05 mM, indicando que uma das respostas das plantas a limitação de N em plantas de *Arabidopsis* é o aumento da relação raiz/parte aérea (REMANS et al., 2006). Sperandio et al. (2011) também constataram que plantas de arroz da variedade Nipponbare após um período de 72 ou 75 horas sem N-NO_3^- apresentaram um aumento na relação raiz/parte aérea.

4.2.3 Análises das frações nitrogenadas e açúcares solúveis

Para o tratamento onde as plantas foram submetidas ao cultivo constante com 0,2 mM de N-NO_3^- , os maiores teores de nitrato foram encontrados na raiz e bainha (Figuras 8C e D), sendo as variedades Manteiga e Piauí as que acumularam maiores quantidades (embora a variedade Piauí não tenha diferido significativamente das variedades Caiapó e IAC 47) (Tabelas 13 e 14, Anexo). Isso pode estar relacionado a uma maior capacidade dessas variedades em absorver e/ou acumular o nitrato quando o mesmo se encontra em baixas concentrações. Após absorvido, o nitrato pode ser armazenado em vacúolos ou reduzido a amônio pela ação sequencial das enzimas Nitrato Redutase (NR) e Nitrito Redutase (NiR) (Souza e Fernandes, 2006). Esse processo pode ocorrer nas raízes, mas preferencialmente na parte aérea, ou seja, após absorvido pelas raízes o nitrato é enviado para a bainha, indicando que esse tecido funciona como local de armazenamento desse íon. Em trabalho realizado por Santos et al (2005) com variedades de arroz cultivadas sob altas doses de nitrato, a bainha também apresentou maiores teores de nitrato concomitante com uma menor atividade da NR.

Não foram encontrados teores detectáveis de N-NH_4^+ na bainha e raiz das variedades analisadas. Isso pode ocorrer principalmente pelo fato de que, quando as plantas absorvem o nitrato através do sistema radicular, esse íon preferencialmente é transportado para a parte aérea para que lá possa ser reduzido e em seguida assimilado (Souza e Fernandes, 2006). Na folha os maiores teores de N-NH_4^+ foram encontrados para as variedades Piauí e Manteiga para o tratamento 0,2 mM (Figura 8B). Para a variedade Caiapó não foram encontrados teores detectáveis de N-NH_4^+ na folha.

Os maiores teores de N- amino, açúcar solúvel, N total e N total reduzido foram encontrados na folha (Figuras 9 e 10). Isso ocorre pelo fato de que nas folhas é onde ocorre principalmente os processos de redução e assimilação de N, e também é onde principalmente ocorre a síntese de proteínas, ou seja, onde o metabolismo de N é mais intenso, e para que os processos de redução e assimilação ocorram, são necessários energia, poder redutor e esqueletos de carbono (açúcares) (Souza e Fernandes, 2006).

Quando as plantas foram submetidas ao tratamento com 2 mM constante houve um aumento nos teores de açúcares solúveis na folha, com destaque para a variedade Caiapó

Ao contrário das demais variedades, para variedade Piauí os maiores teores de N-NH_4^+ , N- amino e N total reduzido nas folhas foram encontrados para o tratamento de 0,2 mM constante, indicando que sob baixo suprimento de N essa variedade pode ser mais eficiente na redução e assimilação do N absorvido. Resultados similares com arroz foram encontrados por Santos et al. (2011).

Na folha, os maiores teores de amônio, N- amino e N total reduzido para o tratamento com 0,2 mM constante foram encontrados para as variedades Piauí e Manteiga. Isso pode estar associado com uma maior eficiência em assimilar o N absorvido por essas variedades quando em baixa concentração, tendo em vista que essas variedades são originárias do sistema de sequeiro no Maranhão- RJ, e que foram cultivadas por anos sob baixas disponibilidade de N. A variedade Manteiga também apresentou altos teores de amônio, N amino e N total reduzido comparada com as demais variedades para o tratamento com 2 mM constante de NO_3^- .

A absorção e assimilação de N pelas raízes podem mudar em relação ao fornecimento de N, de forma que o estado nutricional das plantas é de alguma forma sentido e pode ser regulado por processos de *feedback*. Como na assimilação do nitrato há a formação em sequência de nitrito (via NR), amônio (via NiR) e por último, aminoácidos, isso sugere que os teores internos dos metabólitos do N, como por exemplo, aminoácidos, nitrato e proteínas, podem regular a absorção e assimilação de N nas plantas (Miller et al., 2007).

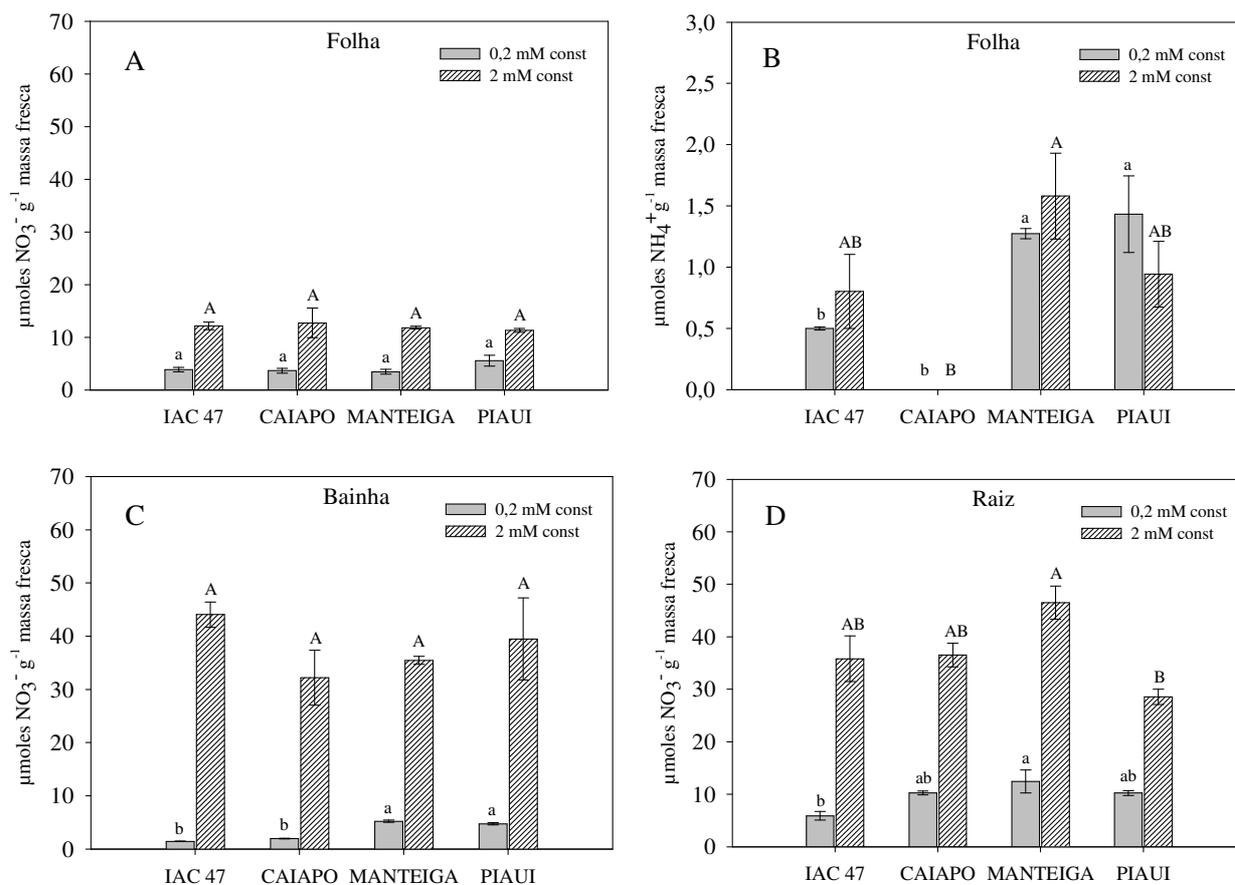


Figura 8. Teores de nitrato (N-NO₃⁻) e amônio (N-NH₄⁺) na folha (A e B), bainha (C) e raiz (D) das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Mesma letra maiúscula não difere significativamente entre si para o tratamento de 2 mM constante e mesma letra minúscula difere significativamente entre si para o tratamento de 0,2 mM constante (Teste de Tukey, p<0,05). As barras indicam o erro padrão.

Plantas de mutantes *Arabidopsis* tolerantes à baixa disponibilidade de N, nomeadas *Int1*, acumularam mais aminoácidos livres sob deficiência de N comparadas com as plantas tipo selvagem, indicando que uma melhor assimilação de N é um dos fatores que podem contribuir para uma tolerância a baixa disponibilidade de N (Teng et al., 2010). Isso pode justificar os resultados aqui encontrados para as variedades Piauí e Manteiga.

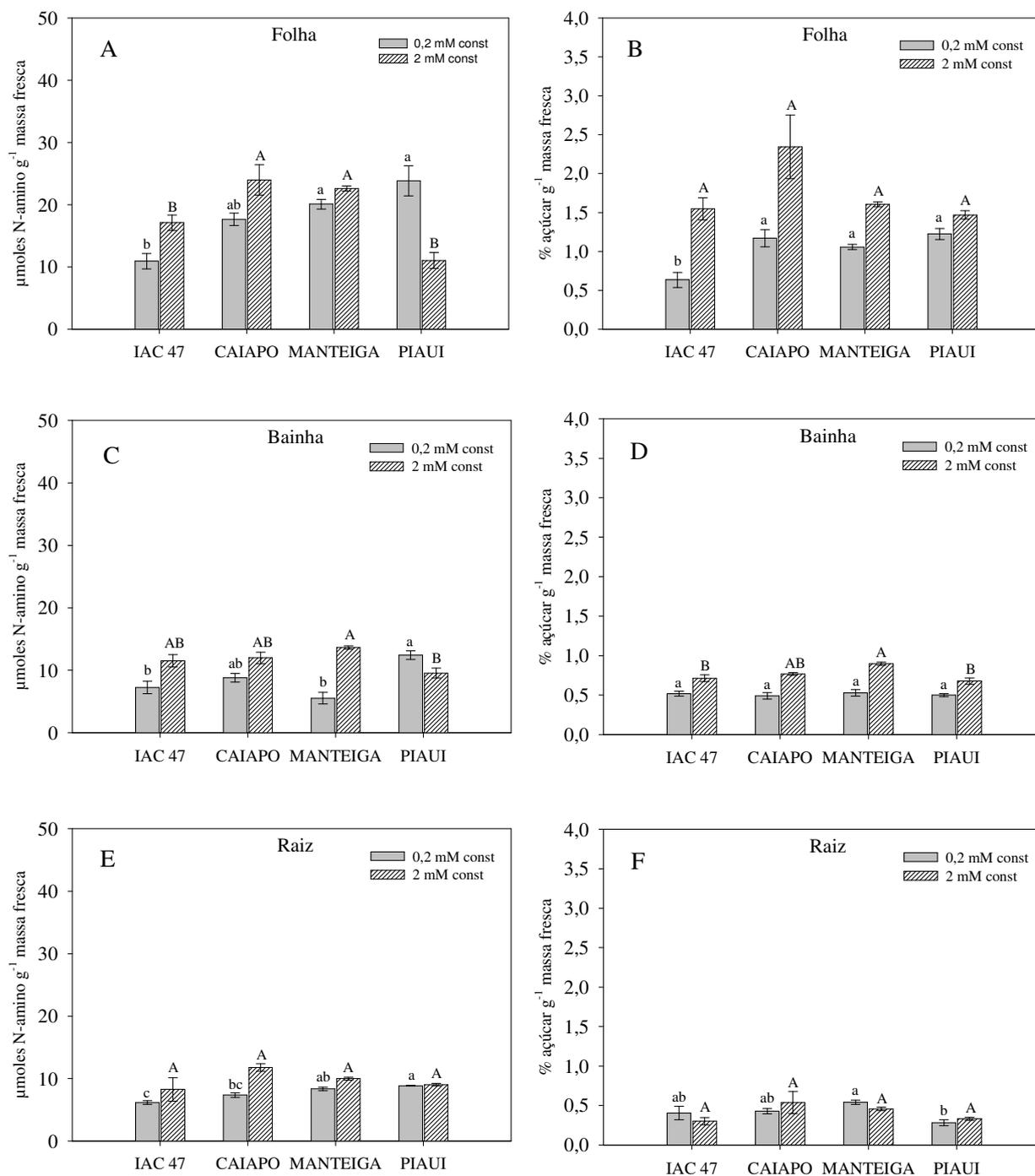


Figura 9. Teores de N-amino e porcentagem de açúcar na folha (A e B), bainha (C e D) e raiz (E e F) das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Mesma letra maiúscula não difere significativamente entre si para o tratamento de 2 mM constante e mesma letra minúscula difere significativamente entre si para o tratamento de 0,2 mM constante (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

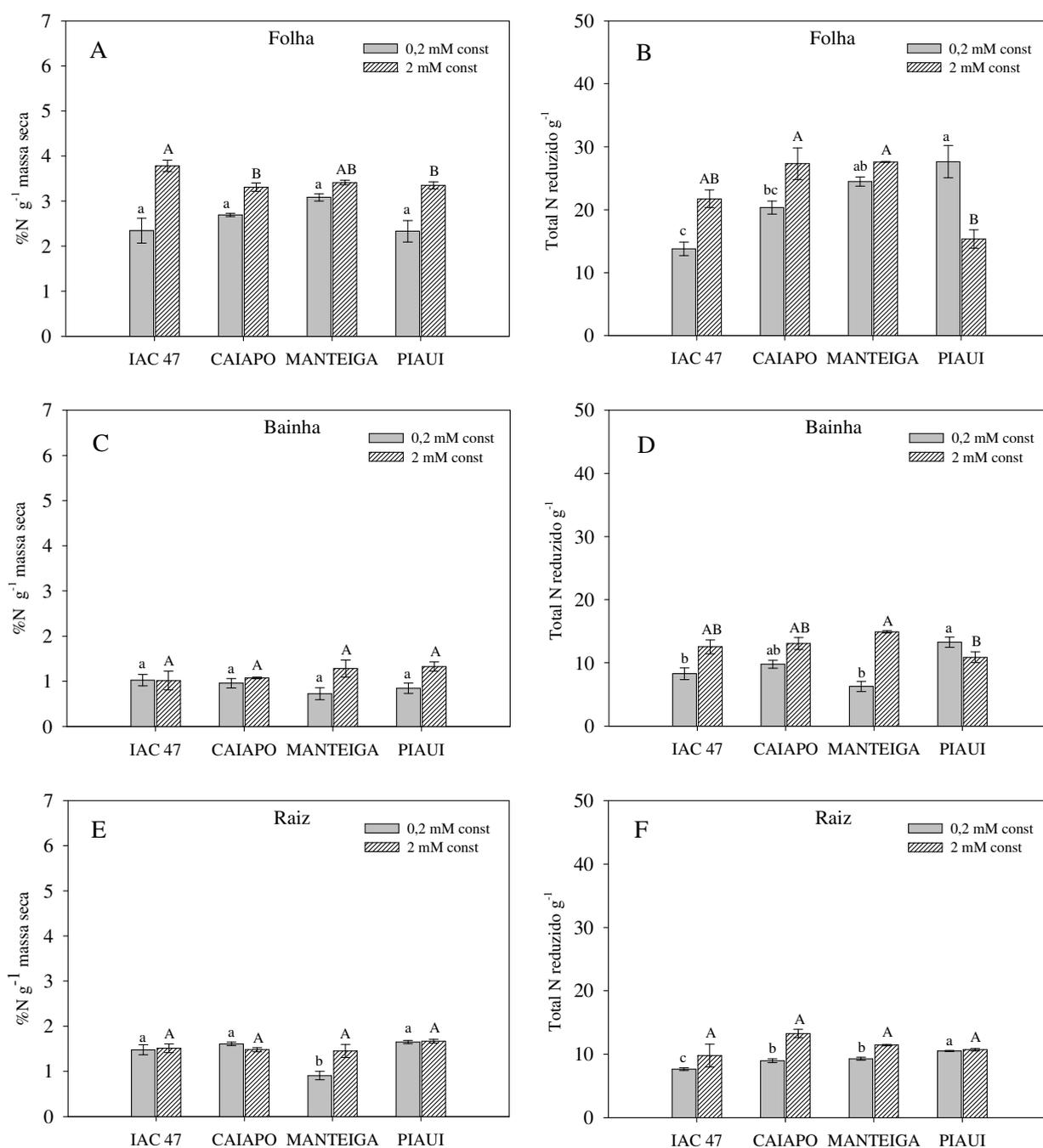


Figura 10. Porcentagem de N-total e de N- total reduzido na folha (A e B), bainha (C e D) e raiz (E e F) das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Mesma letra maiúscula não difere significativamente entre si para o tratamento de 2 mM constante e mesma letra minúscula difere significativamente entre si para o tratamento de 0,2 mM constante (Teste de Tukey, $p < 0,05$). As barras indicam o erro padrão.

4.2.4 Análise da expressão gênica dos transportadores de NO_3^- e da proteína NAR

Foi avaliada a expressão gênica dos transportadores de NO_3^- (*OsNRT1.1*, *OsNRT1.2*, *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*) e das proteínas regulatórias NAR (*OsNAR2.1* e *OsNAR2.2*) por PCR em tempo real, a fim de verificar o efeito da nutrição níttrica bem como da deficiência de N sobre a expressão desses genes nas quatro variedades de arroz estudadas.

Houve indução para todos os transportadores de alta afinidade (*OsNRT2.1* e 2.3), do transportador de baixa afinidade *OsNRT1.2* e das proteínas NAR (*OsNAR2.1* e *OsNAR2.2*) no tratamento com 0,2 mM constante (Figura 11). O transporte de NO_3^- é feito por meio de sistemas de transporte de alta e baixa afinidade (Souza e Fernandes, 2006). Esses sistemas de transporte operam de acordo com a concentração externa de N-NO_3^- , onde o sistema de transporte de alta afinidade (HATS, do inglês *High Affinity Transport System*) opera em baixas concentrações (< 1 mM), e os sistemas de baixa afinidade (LATS, do inglês *Low Affinity Transport System*) que opera em concentrações mais elevadas (> 1 mM) (Dechorgnat et al., 2011). Os transportadores de alta afinidade, os quais podem ser induzidos (iHATS) ou constitutivos (cHATS), são codificados pela família NRT2, e os transportadores de baixa afinidade são codificados pela família NRT1 (Araki e Hasegawa, 2006), com exceção do transportador NRT1.1 que pode atuar tanto no sistema de alta como baixa afinidade em função das condições externas de nitrato (Dechorgnat et al., 2011). Alguns transportadores da família NRT2 requerem a presença da proteína acessória NAR2, para adquirir a capacidade de transportar o nitrato (Kotur et al., 2012).

Os transportadores que apresentaram maior expressão sob baixa disponibilidade de N foram: *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2*, sendo mais expressos nas variedades IAC-47 e Piauí. Resultados similares também foram encontrados por Takayanagi et al. (2011). Os transportadores NRT2.1 e 2.2 tem um importante papel na absorção de nitrato em baixas concentrações (sistema HATS). Plantas de *Arabidopsis* mutantes com uma completa deleção do gene *AtNRT2.1* em conjunto com a deleção da região 3' do gene *AtNRT2.2* apresentaram uma forte redução na atividade do HATS comparada com as plantas *wild-type*, apresentando uma redução de 73% na V_{\max} (Filleur et al., 2001). Li et al. (2006) também utilizando plantas de *Arabidopsis* constataram que a interrupção conjunta da atividade dos transportadores *AtNRT2.1* e *AtNRT2.2* resultou em uma redução no transporte de alta afinidade induzido pela presença de NO_3^- (iHATS) em mais de 80%, enquanto que para o sistema de alta afinidade constitutivo (cHATS) houve uma redução de 30%.

Houve redução na expressão do *OsNRT1.1* em ambos os tratamentos, exceto para a variedade Piauí que teve uma indução de pouco mais de 1 vez. Resultados similares foram encontrados por Sperandio et al. (2011) em que plantas de arroz da variedade Nipponbare cultivadas com até 75 horas sem N não apresentaram indução para o *OsNRT1.1* nas raízes. Os transportadores NRT1.1 funcionam também como sensores, possuindo sítios de alta e baixa afinidade para o NO_3^- capaz de perceber uma ampla faixa de concentração de nitrato no solo e gerar diferentes níveis de resposta primária através da fosforilação no resíduo T101 pela CIPK23 (Ho et al., 2009). O NRT1.1 de *Arabidopsis* funciona também como regulador da expressão dos *AtNRT2*. Munõs et al. (2004) utilizando plantas de *Arabidopsis* defectivas no NRT1.1 constataram que esse gene apresenta um importante papel na regulação do NRT2.1 e na atividade do HATS.

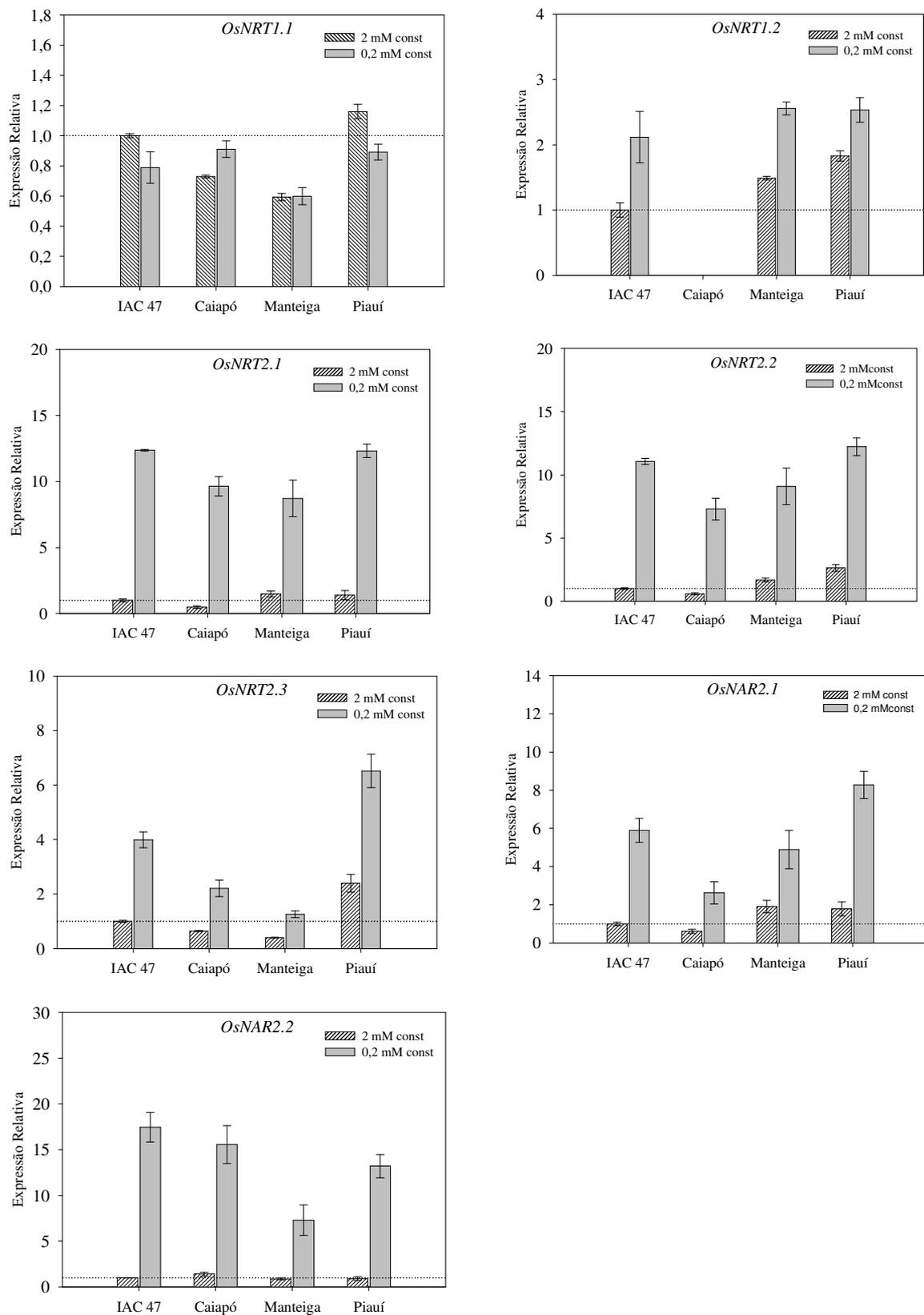


Figura 11. Expressão dos transportadores de nitrato em raízes de plantas de arroz das variedades IAC-47, Caiapó, Manteiga e Piauí submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. As barras indicam o erro padrão.

Maiores níveis de expressão do transportador *OsNRT2.3* foram observados para a variedade Piauí (aproximadamente 6 vezes), enquanto que o menor nível foi detectado para a variedade Manteiga (pouco mais de 1 vez). Com o resultado de uma busca no banco de dados de EST (*Expression Sequence Tags* - Fragmentos de Sequências Expressas) em conjunto com uma detalhada análise de expressão Feng et al. (2011), constataram que o gene *OsNRT2.3* sofre um *splicing* alternativo dando origem a duas proteínas: *OsNRT2.3a* e *OsNRT2.3b*. Os *primers* utilizados nesse trabalho são capazes de detectar a isoforma *OsNRT2.3a*. Em *Arabidopsis* o *AtNRT2.3* é expresso principalmente na parte aérea, mas também detectado em raízes (Orsel et al., 2002). Plantas de *Arabidopsis* tiveram um aumento na expressão do *AtNRT2.3* de 6 vezes quando cultivadas sob baixa disponibilidade de NO_3^- (0,5 mM) (Orsel et al., 2002). Plantas de arroz mutantes defectivas na expressão do *OsNAR2.1* tiveram uma redução na expressão dos transportadores *OsNRT2.1*, *2.2* e *2.3a* em até 90% em relação à plantas normais, indicando uma intrínseca relação entre esse quatro genes (Yan et al., 2011).

A maior expressão para *OsNAR2.1* foi observada para a variedade Piauí (aproximadamente 8 vezes) e a menor para a variedade Caiapó (aproximadamente 3 vezes). Resultados anteriores demonstraram que a proteína *OsNAR2.1* interage com os transportadores *OsNRT2.1*, *2.2* e *2.3a* tornando-os funcionais para o transporte de NO_3^- (Yan et al., 2011; Feng et al., 2011). Estudos recentes com *Arabidopsis* demonstraram que existe a formação de um complexo com uma massa molecular de aproximadamente 150kDa formado de duas unidades de *AtNAR2.1* e duas de *AtNRT2.1* (Yong et al., 2010). O mesmo estudo sugere que apenas o complexo *AtNAR2.1/AtNRT2.1* esta envolvido no HATS e não apenas a forma monomérica do *AtNRT2.1*. Essa hipótese é apoiada pelo fato de que a injeção conjunta de mRNA do *AtNAR2.1* e *AtNRT2.1* em ovócitos de sapo aumentaram o acúmulo de ^{15}N em 536% comparados com o controle (Kotur et al., 2011).

A maior expressão para o *OsNAR2.2* foi observada para a variedade IAC-47 (acima de 15 vezes) e a menor foi para a variedade Manteiga (por volta de 7,5 vezes). Ao contrário da proteína *OsNAR2.1*, não foi constatada nenhuma evidencia de interação entre a *OsNAR2.2* e os transportadores *OsNRT2*. Simultaneamente a injeção de mRNA de *OsNAR2.2* e *OsNRT2.1* em ovócitos não resultou em aumento significativo na absorção de ^{15}N , o mesmo ocorreu para *OsNRT2.3a* e *b* (Feng et al., 2011).

A variedade Piauí apresentou os maiores valores de expressão para os componentes do HATS. Essa resposta pode estar relacionada à adaptação dessa variedade a uma agricultura de baixo uso de insumos, comum de agricultores de subsistência no estado do Maranhão. Esse estado é caracterizado por duas estações bem definidas: uma caracterizada por um período de seca e outra por um período chuvoso. As oscilações entre os períodos chuvosos e secos fazem com que haja um *flush* sazonal de N no solo, pois no início do período chuvoso inicia-se a mineralização da matéria orgânica, aumentando o N no solo, que em seguida é perdido rapidamente por lixiviação. Assim, as variedades desse local, sobretudo a variedade Piauí, são caracterizadas por ter alta eficiência de absorção e acúmulo de NO_3^- após o início do período de chuvas. Como o HATS opera em uma faixa de concentração menor que 1mM (Dechorgnat et al., 2011), uma maior expressão desses transportadores pode estar relacionada com a absorção mais eficiente quando o N-NO_3^- é limitante no solo.

A variedade Caiapó não apresentou expressão para o transportador *OsNRT1.2*. Em *Arabidopsis* foi constatado que o *AtNRT1.2* é um componente constitutivo do LATS expresso nos pelos radiculares e na epiderme das pontas e regiões maduras da raiz, com K_m para o NO_3^- de aproximadamente 5,9 mM (Huang et al., 1999). Entretanto, em arroz, esse transportador ainda não foi caracterizado e a sua função no transporte de nitrato permanece desconhecida, e de acordo com esse trabalho, possivelmente não tem expressão constitutiva em raízes de arroz, haja vista a sua não expressão para a variedade Caiapó. Isso é baseado no fato de que uma árvore filogenética feita em transportadores da família NRT1 demonstrou certa diferença

nesses transportadores entre *Arabidopsis* e arroz, no qual esses transportadores em arroz se assemelham mais aos de gramíneas (sorgo, milho e *Brachypodium*) (Plett et al., 2010).

4.2.5 Ajuste do protocolo para a análise de polimorfismo amplificado sensível a metilação (MSAP)

Para que o protocolo para a análise de metilação fosse ajustado foi necessária uma série de testes no qual foram avaliados: tampões para as enzimas de restrição, concentração do DNA e número de ciclos nas reações de PCR, etc. (Tabela 8). O resultado de cada teste foi analisado em um gel de agarose 2% corado com GelRedTM.

Tabela 8. Resumo do ajuste de protocolo para a análise do perfil de restrição sensível a metilação (MSAP)

Número	Teste	Resultado
1	Restrição com três tampões diferentes (A, B (Promega) e On for All).	Melhor eficiência de restrição com o tampão B para as enzimas MspI e EcoRI e com o tampão A para a Enzima HpaII.
2	O teste constou em fazer a PCR de pré-amplificação de duas maneiras: a primeira normalmente foi feita como descrito nos protocolos usados e a segunda purificando o produto da ligação com PCR usando o kit <i>clean up system</i> (Promega).	Não houve diferença entre as duas metodologias. Aparecimento de "arraste" ao invés de bandas.
3	O teste constou em fazer as etapas de ligação das seguintes formas: a) Correr um gel da restrição e depois retirar a banda (por volta de 250bp) e purificar com PCR <i>clean up</i> ; b) Precipitar o DNA produto da restrição com clorofórmio e etanol; c) Fazer a restrição e ligação juntas sem purificação e; d). Fazer a restrição e ligação separadas sem purificação.	Não houve diferença entre as duas metodologias. Aparecimento de "arraste" ao invés de bandas.
4	O teste constou em fazer a etapa de PCR seletiva utilizando os produtos da PCR de pré-amplificação do teste anterior, diluindo com TE 1x de três maneiras: 1:2, 1:5 e 1:10.	Aparecimento de bandas apenas nas diluições 1:5 e 1:10.
5	O teste constou em fazer a etapa de PCR de pré-amplificação diluindo os produtos de ligação com TE 1x de uma única maneira: 1:10.	Aparecimento de bandas fracas e ainda com aparecimento de arraste.
6	O teste constou em fazer a etapa de PCR de pré-amplificação diluindo os produtos de ligação com TE 1x de três maneiras: 1:10, 1:20 e 1:30.	Aparecimento de bandas fracas e ainda com aparecimento de arraste.
7	O teste constou em fazer a PCR de pré-amplificação com temperaturas de anelamento diferentes e a PCR seletiva com volumes diferentes. Para fazer a PCR de pré amplificação e seletiva os produtos foram diluídos 20x.	Aparecimento de bandas fracas e ainda com aparecimento de arraste.
8	O teste constou em fazer a PCR de pré-amplificação com temperaturas de anelamento diferentes (56°C, 55°C, 54°C e 53°C) e a PCR seletiva com quantidades diferentes de DNA (1µL DNA + 4µL TE 1x , 2µL DNA + 3µL TE 1x, 3µL DNA + 2µL TE 1x, 4µL DNA + 1µL TE 1x, 5µL DNA). Para fazer a PCR de pré-amplificação o produto da ligação foi diluído 20x.	Aparecimento de bandas apenas para as amostras em a PCR de pré-amplificação foi feita com as temperaturas de anelamento de 53 e 54°C.
9	O teste constou em fazer a PCR de pré-amplificação com duas temperaturas de anelamento diferentes (56°C e 53°C) e a PCR seletiva com diluições diferentes (20, 30, 40, 50 e 60x). Para fazer a PCR de pré-amplificação o produto da ligação foi diluído 20x.	Aparecimento de "arraste" ao invés de bandas para todas as amostras inclusive para o controle que era feito usando TE 1x ao invés de DNA. Conclusão de que os <i>primers</i> utilizados na PCR de pré-amplificação estavam contaminados.
10	Neste teste todas as etapas foram alteradas de acordo com o protocolo de García et al, 2010 modificado como descrito acima. As diluições da PCR de pré-amplificação foram: 10, 20 e 30x. (todas feitas com H ₂ O DEPC). As diluições da PCR seletiva foram: 10, 20, 30 e 40x (todas feitas com H ₂ O DEPC).	Aparecimento de bandas para todas as diluições e estabelecimento do protocolo como está descrito acima na metodologia.

4.2.6 Análise da alteração no padrão de metilação da citosina

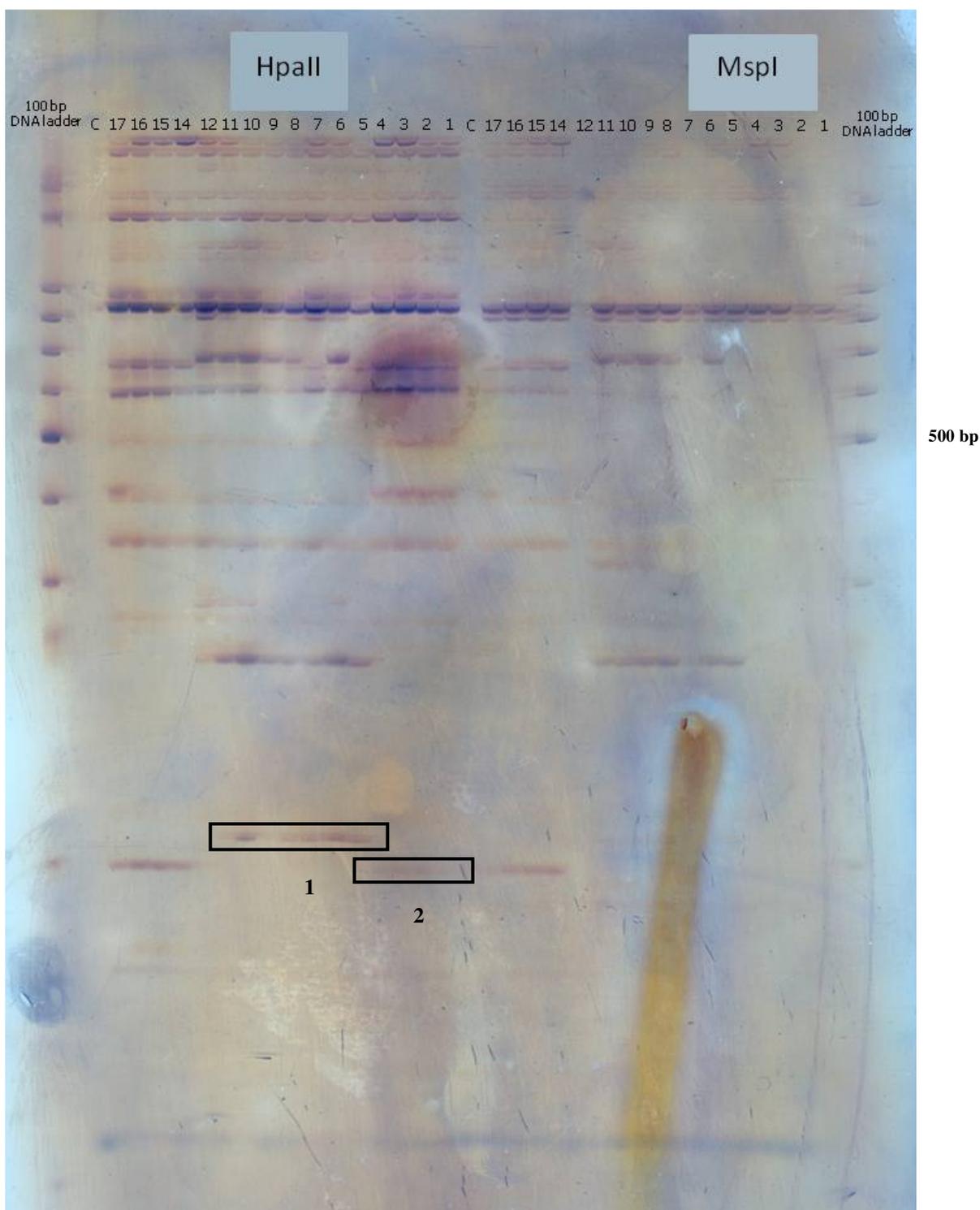


Figura 12. Gel de acrilamida 5% para avaliar o perfil de restrição sensível a metilação em raízes das variedades de arroz Manteiga (1, 2, 3, 4), IAC 47 (5, 6, 7 e 8), Caiapó (9, 10, 11 e 12) e Piauí (14, 15, 16) submetidas ao tratamento com 0,2 mM constante de nitrato coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. C= controle (feito com água ao invés de DNA). Os números 1 e 2 indicam a presença de metilação do tipo CHG.

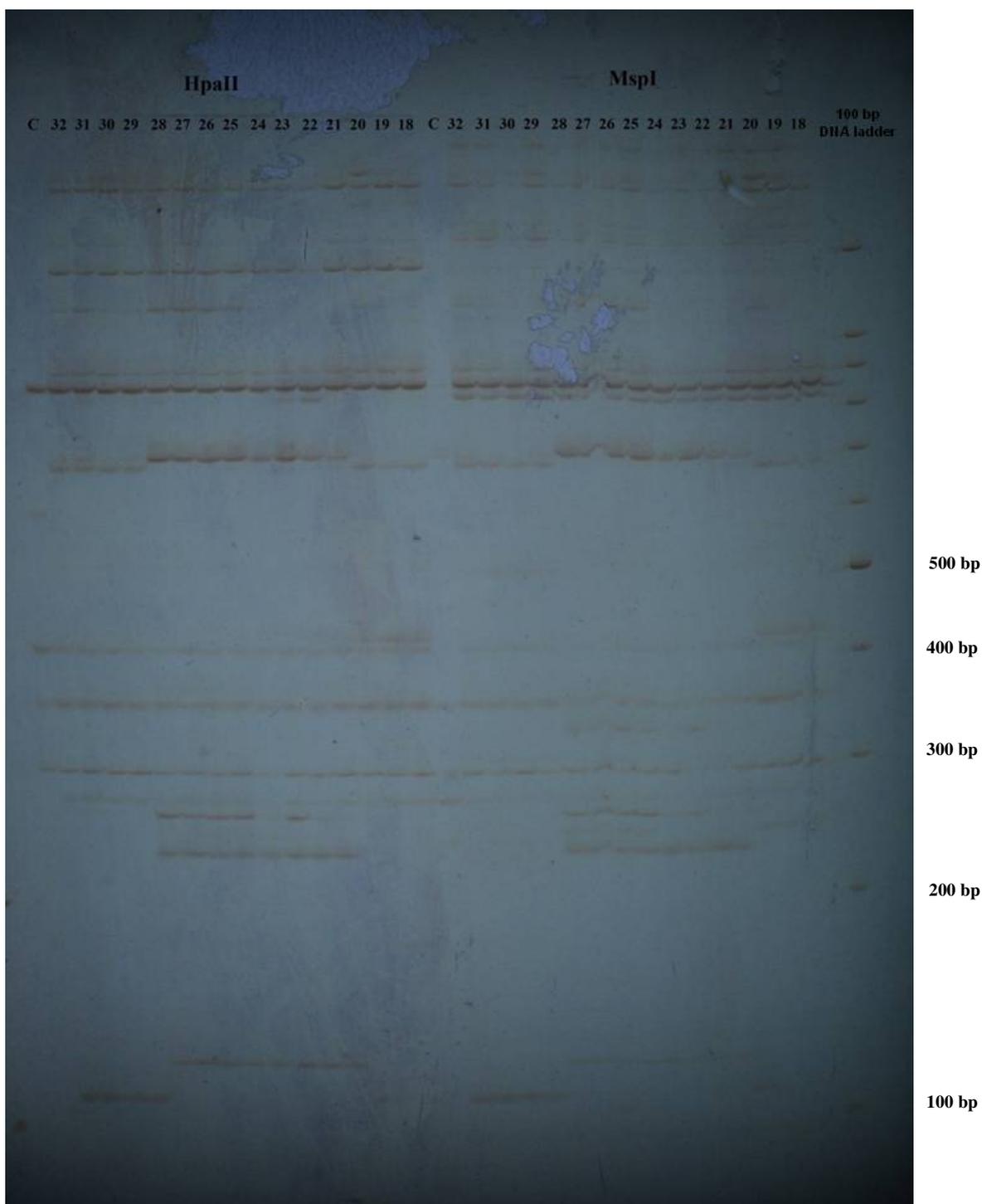


Figura 13. Gel de acrilamida 5% para avaliar para avaliar o perfil de restrição sensível a metilação em raízes das variedades de arroz Manteiga (18, 19 e 20), IAC 47 (21, 22, 23 e 24), Caiapó (25, 26, 27 e 28) e Piauí (29, 30, 31 e 32) submetidas ao tratamento com 2 mM constante de nitrato coletadas no 21^o DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

Como podemos observar nas Figuras 12 e 13 nos fragmentos maiores que 500 pb, há um maior aparecimento de regiões não metiladas (as bandas estão presentes na restrição com HpaII e MspI) para todas as variedades independente do tratamento, contudo, em fragmentos menores que 500 bp houve um maior polimorfismo de restrição sensível a metilação.

No tratamento com $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$, para os fragmentos menores que 500 pb pode se observar o aparecimento de metilação do tipo CHG (Figura 14-1 e 2) para as variedades IAC 47 e Caiapó em função do perfil de bandas observado. Já para o tratamento com 2 mmol L^{-1} , em fragmentos menores que 500 pb, para os mesmos pares de *primers*, há apenas o aparecimento de regiões não metiladas (Figura 13), indicando que as metilações podem ocorrer de forma diferenciada em função da dos teores de N- NO_3^- .

A adaptação a condições limitantes de N é um fator importante que as plantas usam com estratégia de sobrevivência (Kant et al., 2011). Vários estudos mostram que o estresse provocado pela deficiência de N pode causar alterações no metabolismo de proteínas e aminoácidos nas raízes, como já observado em plantas de trigo (Moller et al., 2011). Sob condições limitantes de N, varias mudanças fisiológicas e bioquímicas podem ocorrer no metabolismo vegetal, incluindo aumento de absorção por transportadores de alta afinidade, remobilização das folhas velhas para as partes reprodutivas, diminuição do crescimento e fotossíntese e acúmulo de antocianina (Kant et al., 2011). Dentre os efeitos da limitação de N sob o metabolismo vegetal pouco se conhece sobre esses efeitos nas alterações no padrão de metilação da citosina. Nossos resultados (apresentando resultados inéditos) demonstraram que a disponibilidade diferencial de NO_3^- pode influenciar no padrão de metilação da citosina.

De um modo geral, as variedades de arroz estudadas apresentaram maior porcentagem de metilação nos sítios 5'-CCGG quando submetidas ao tratamento de 2 mM constante, exceto a variedade Manteiga que apresentou maior porcentagem de metilação nos sítios 5'-CCGG quando submetida ao tratamento com 0,2 mM constante, passando de 18,18% quando submetida ao tratamento de 2 mM constante para 26,67% no tratamento com 0,2 mM constante.

Também podemos observar que houve diferença entre os tipos de metilação (CG e CHG) em função do tratamento com NO_3^- . Para o tratamento com 0,2 mM foi observada maior porcentagem de metilação do tipo CHG (Figura 14A) e para o tratamento com 2 mM houve maior porcentagem de metilação do tipo CG (Figura 14B). Resultados similares também foram encontrados por Kou et al. (2011), em que variedades de arroz apresentaram maior porcentagem de metilação do tipo CG quando cultivadas com até 10 mg.L^{-1} (aproximadamente 0,7 mM) de NH_4NO_3 . Yu et al. (2013) avaliando plantas de *Leymus chinensis*, também constataram que quando adicionado N na forma de NH_4NO_3 (10 g de N.m^{-2}) houve maior porcentagem de metilação do tipo CG. No entanto nenhum estudo foi realizado usando apenas NO_3^- como fonte de N, e utilizando concentrações tão baixas (0,2 mM).

Estudos recentes demonstraram que há alteração na porcentagem de metilação dos sítios 5'-CCGG em plantas de arroz quando submetidas ao estresse salino, onde de um modo geral houve maior porcentagem de metilação do tipo CHG quando as plantas foram submetidas a essa condição (Karan et al., 2012), assim como plantas de arroz sensíveis (variedade II-B) tiveram maior proporção de metilação CHG em relação as plantas resistentes (variedade Huhan-3) quando submetidas ao estresse hídrico (Zeng et al., 2013), indicando junto com os resultados aqui encontrados, que plantas de arroz podem sofrer alterações no padrão de metilação do DNA dependendo do ambiente a qual são inseridas e que o tipo de metilação pode estar relacionado com a resposta das plantas a um estresse.

Para avaliar se há interação entre os tratamentos e os tipos de metilação foi realizado o teste do qui quadrado ($p < 0,005$), o qual foi significativo (Tabela 9), indicando que há interação entre os tipos de metilação aqui estudada (CG e CHG) e as doses de nitrato aplicadas (2 e 0,2 mM constante). Esse resultado indica que quando sob estresse nitrogenado ($0,2 \text{ mM de N-NO}_3^-$), as variedades de arroz mostram um predomínio de alterações de metilação na citosina do tipo CHG, o qual pode estar envolvido na adaptação das variedades a baixa disponibilidade de N.

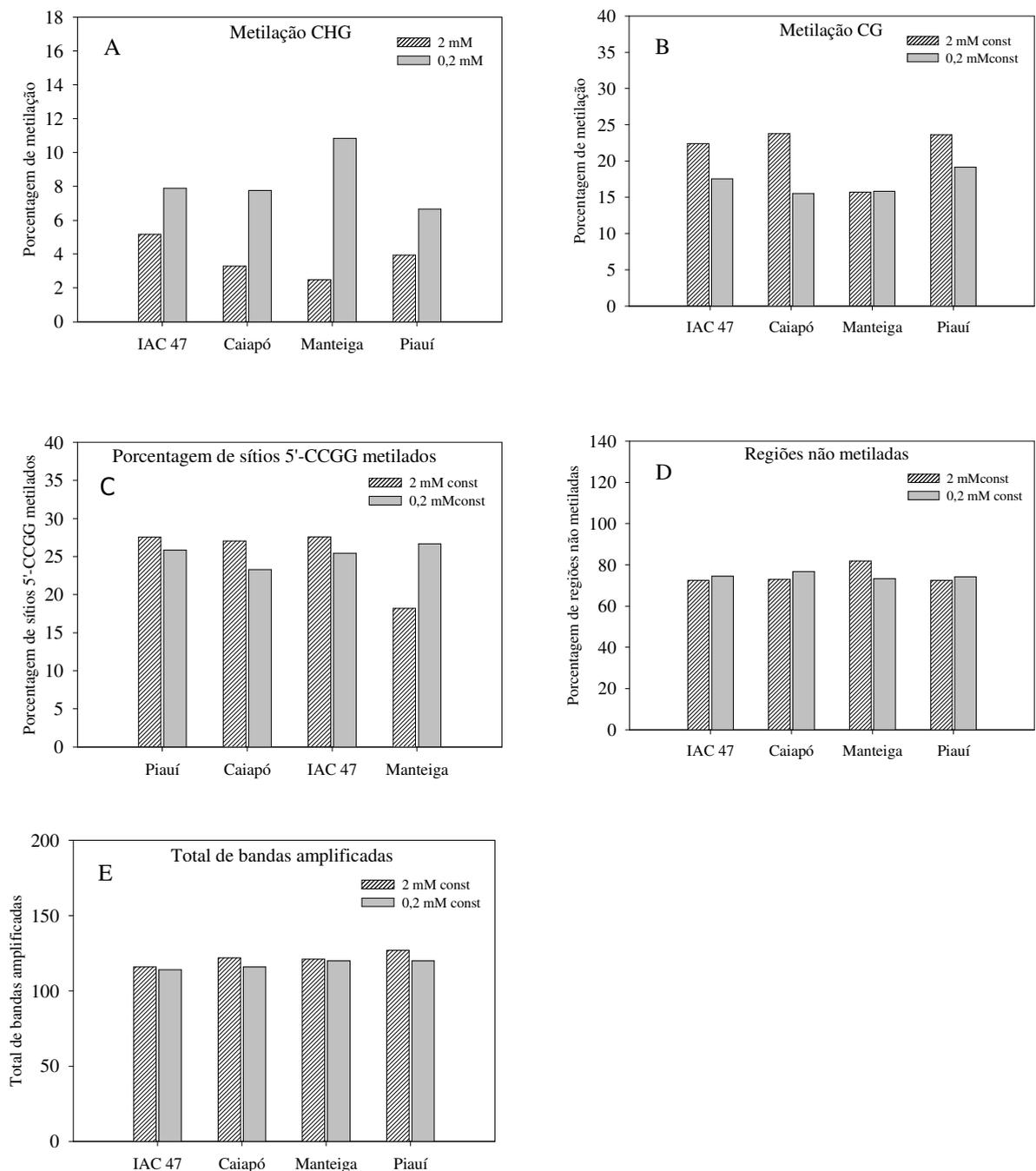


Figura 14. Porcentagem de metilação CHG (A) e CG (B), porcentagem de sítios 5'-CCGG metilados (C), regiões não metiladas (D) e total de bandas não amplificadas (E) obtidas por meio da técnica de MSAP em raízes de plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM e 0,2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

Podemos observar que a variedade Manteiga apresentou maior porcentagem de metilação do tipo CHG (Figura 14A) quanto submetida ao estresse nitrogenado (tratamento com 0,2 mM constante), passando de 2,48% (tratamento com 2 mM constante) para 10,83% (tratamento com 0,2 mM constante). Possivelmente, essas alterações no padrão de metilação podem estar relacionadas a uma adaptação da variedade a baixas concentrações de N. Quanto

à metilações do tipo CG, a variedade Manteiga não apresentou diferenças entre os percentuais de metilação para ambos os tratamentos (Figura 14B), enquanto que as demais variedades apresentaram maior porcentagem para o tratamento com 2 mM.

A variedade Caiapó apresentou maior variação de porcentagem de metilação do tipo CG entre os dois tratamentos, passando de 15,52% (tratamento com 0,2 mM constante) para 23,77% (tratamento com 2 mM constante).

Estudos recentes mostraram que o estresse abiótico pode causar alteração no padrão de metilação do DNA em plantas. Cao et al. (2012), analisando plantas de *Chloris virgata* constataram que sob estresse alcalino e salino há alterações no padrão de metilação do DNA, que pode estar envolvidas na adaptação dessa espécie a condições salinas e alcalinas. Plantas de trigo apresentaram hipometilação dependente da dose de NaCl nas sequencias CCGG, sendo a maior porcentagem de hipometilação na maior dose (150 mM) (Zong et al., 2009). Em variedades de milho também foram observadas alterações no padrão de metilação da citosina quando as plantas foram submetidas a baixo pH e toxidez por alumínio (Kimatu et al., 2013).

Zeng et al. (2013), demonstraram que plantas de arroz apresentam diferenças no padrão de metilação do DNA quando submetidas ao estresse hídrico durante seis gerações, em que a sexta geração apresentou uma maior variação nas alterações de metilação entre o grupo controle (sem estresse) e o tratamento com estresse hídrico, e que essas alterações podem ser herdadas para as próximas gerações. Ou et al. (2012) analisando plantas de arroz cultivadas com os metais pesados: Cu^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+3} e Hg^{+2} , verificaram que as alterações no padrão de metilação do DNA eram dependentes da dose do íon.

Não houve diferença para as regiões não metiladas e para o total de bandas amplificadas, seja entre as variedades ou entre os tratamentos, como pode ser observado na Figura 14 D e E.

Tabela 9. Total de bandas amplificadas para cada tratamento e tipo de metilação CG, CHG e RNM (regiões não metiladas), obtidas por meio da técnica de MSAP em raízes de plantas de arroz das variedades IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM e 0,2 mM constante, coletadas no 21º DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Fora dos parênteses se encontram os valores observados e dentro dos parentes os valores esperados.

Tratamento	Tipo de metilação do DNA			Total
	CHG	CG	RNM	
0,2 mM const	39(28,02)	80(90,46)	351(351,52)	470
2 mM const	18(28,98)	104(93,54)	364(363,48)	486

$$\chi^2_{\text{Calc}}: 10,84 / \chi^2_{\text{tab}}(2, 0,5\%): 10,5965$$

4.2.7 Análise da similaridade epigenética das variedades de arroz por meio da distância de Jaccard

As distâncias epigenéticas entre as quatro variedades de arroz foram estimadas por meio da distância de Jaccard (Jaccard, 1908) a partir da matriz binária obtida por meio dos resultados da técnica de MSAP.

Com base na matriz de dissimilaridade gerada foram testados quatro métodos de agrupamento hierárquicos para estimar o ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma gerado. Foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (CCC) (Sokal & Rohlf, 1962) (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado da análise consistência do agrupamento em quatro métodos de agrupamento hierárquicos por meio do programa estatístico R com base na distância de Jaccard para quatro variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM (A) e 0,2 mM (B) constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva. Os dados foram obtidos por meio da técnica de MSAP.

	Vizinho mais próximo	Vizinho mais distante	UPGMA	Ward
Tratamentos	Coefficientes de correlação cofenética (CCC)			
0,2 mM	0,9173122	0,9252321	0,9322008	0,9043270
2mM	0,9764258	0,9800262	0,9808627	0,9599202

O método mais adequado entre os quatro testados foi o UPGMA, pois apresentou uma menor distorção, ou seja, um maior valor de CCC tanto para o tratamento de 0,2 mM (0,9322008), quanto para 2 mM (0,9808627) (Tabela 11). Geralmente com a criação do dendrograma, as informações originais podem ser simplificadas e com isso podem ocorrer distorções sobre o padrão de dissimilaridade entre os genótipos estudados, para tal faz se a adequação do método hierárquico por meio do CCC, em que quanto maior o valor de CCC menor a distorção ao agrupar os genótipos (Cruz e Carneiro, 2006).

Na Tabela 11 são apresentados os valores de similaridade epigenética entres as variedades (índice de Jaccard). Podemos observar que os maiores valores foram observados entre as variedades IAC e Caiapó, tanto para 2 mM constante (0,68), quanto para 0,2 mM constante (0,71), seguido pelas variedades Manteiga e Piauí que apresentaram os valores de 0,61 e 0,63 para os tratamentos de 2 mM constante e 0,2 mM constante respectivamente. Com 0,2 mM constante os valores de similaridade são maiores, indicando que supostamente as variedades estudadas se assemelham mais em suas alterações no perfil de metilação de DNA sob baixa disponibilidade de N- NO₃⁻.

Tabela 11. Similaridade epigenética (índice de Jaccard) entre quatro variedades de arroz: IAC 47, Manteiga, Caiapó e Piauí. As plantas foram submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM (A) e 0,2 mM (B) constante, e coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

2 mM			
	Piauí	Caiapó	IAC 47
Caiapó	0,54		
IAC 47	0,56	0,68	
Manteiga	0,61	0,53	0,54
0,2 mM			
Caiapó	0,55		
IAC 47	0,60	0,71	
Manteiga	0,63	0,57	0,61

Os resultados apresentados na Tabela 11 são comprovados pelo dendrograma gerado a partir do método hierárquico UPGMA (Figura 15), em que foram formados dois grupos, independente do tratamento, um formado pelas variedades IAC 47 e Caiapó e outro formado pelas variedades Piauí e Manteiga.

As variedades Piauí e Manteiga são caracteristicamente utilizadas no estado do Maranhão pelos agricultores no sistema de sequeiro, onde nestas regiões, em função dos períodos chuvosos e secos, ocorre um *flush* sazonal de N no solo. Devido a esse fato, como

podemos observar nos resultados aqui obtidos, essas variedades sob baixa disponibilidade de N apresentam características que parecem conferir uma maior adaptabilidade a essa condição, como por exemplo: aumento na relação raiz/ parte aérea, maior acúmulo de NO_3^- na bainha e raiz, maiores teores de N- amino, NH_4^+ e N total reduzido nas folhas quando submetidas a baixa disponibilidade de N (0,2 mM constante). Também a maior expressão dos transportadores de alta afinidade (HATS) foi observada para a variedade Piauí. Esse comportamento de adaptação à baixa disponibilidade de N por essas variedades corrobora o dendrograma aqui encontrado de similaridade epigenética, tendo em vista que o estresse ambiental pode alterar os padrões epigenéticos e que o mesmo pode ser passado para as gerações subsequentes.

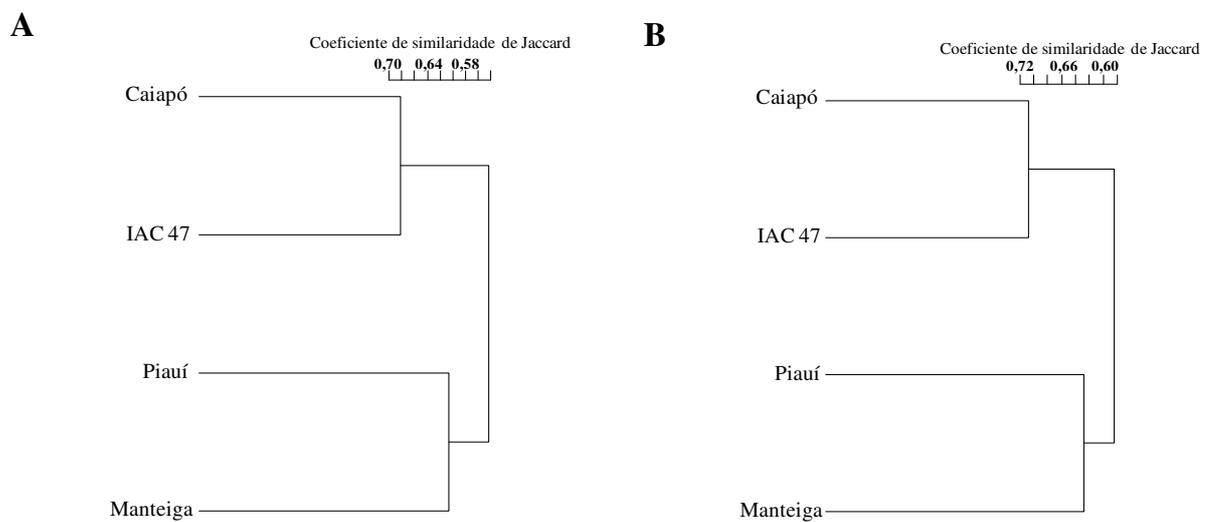


Figura 15. Dendrograma de similaridade construído usando unweighted-pair group method with arithmetic averaging (UPGMA) baseado nas marcas obtidas na técnica de MSAP em raízes das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 2 mM (A) e 0,2 mM (B) constante, coletadas no 21º DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

5 CONCLUSÕES

A disponibilidade diferencial de N durante o cultivo influencia os padrões de metilação do DNA em plantas de arroz. Foi constatado que sob baixa dose de NO_3^- há predomínio de metilação do tipo CHG, e isso pode estar ligado a adaptação dessas plantas a condições limitantes de N. A variedade Manteiga apresentou o maior aumento na porcentagem do tipo CHG quando submetida ao tratamento 0,2 mM em relação ao tratamento com 2 mM de N, assim como uma maior porcentagem de metilação nos sítios 5'-CCGG. Essas alterações podem estar envolvidas na adaptação dessa variedade ao baixo N.

As variedades Piauí e Manteiga apresentaram aumento na relação raiz/parte aérea, maior acúmulo de nitrato na bainha e raiz, maiores teores de N- amino, NH_4^+ e N total reduzido nas folhas quando submetidas a baixa disponibilidade de N (0,2 mM constante). Da mesma forma a variedade Piauí apresentou uma maior expressão nos constituintes do HATS. Isso pode estar relacionado com o local de origem das mesmas, onde são cultivadas sob baixa disponibilidade de N. Essa afirmação pode ser justificada pela similaridade epigenética dessas variedades confirmada pelo agrupamento observado no dendrograma gerado a partir dos dados da técnica de MSAP, onde as variedades locais se agruparam em grupos distintos das melhoradas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento de como as alterações epigenéticas que ocorrem no DNA afetam a absorção, assimilação e acúmulo de N em plantas são informações importantes que podem auxiliar no entendimento dos mecanismos da EUN. No presente trabalho por meio da técnica de MSAP nós podemos observar que a disponibilidade diferencial de NO_3^- influencia nos padrões de metilação do DNA, o qual pode estar relacionado a uma adaptação de variedades de arroz ao baixo suprimento desse nutriente.

Para o mesmo estudo outras técnicas poderiam ser utilizadas como, por exemplo, a análise de metilação do DNA por meio sequenciamento com bissulfito. Essa técnica consiste em tratar o DNA de interesse com bissulfito de sódio, no qual converte a citosina não metilada em uracil, enquanto que a citosina metilada permanece inalterada. Essa técnica pode ser utilizada tanto para uma região alvo como para o genoma total. Com isso novos resultados poderiam ser obtidos, assim como o estudo poderia ser feito para regiões alvo, o qual não é permitido com a técnica de MSAP, pois a mesma abrange o DNA total e de uma forma aleatória.

Os resultados aqui apresentados são apenas informações básicas para o início de uma melhor compreensão de como os mecanismos de metilação do DNA atuam em diferentes concentrações de NO_3^- , portanto novos estudos são necessários para que haja melhor entendimento desses mecanismos e de como eles podem estar relacionados com a EUN.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAKI, R. & HASEGAWA H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. **Breeding Science**, v.56, p.295-302, 2006.
- AVRAMOVA Z. (2010) Epigenetic regulatory mechanisms in plants. In: Trygve Tollefsbol, editors, **Handbook of Epigenetics**. Oxford: Academic Press, 2010, pp. 251-278
- BRERO, A.; LEONHARDT, H.; CARDOSO M.C. Replication and Translation of Epigenetic Information. In **DNA methylation: Basic mechanism**, ed. W. Doerfler and P. Böhm, 21–44. Berlin: Springer-Verlag, 2006.
- CANCELLIER, E. L.; BARROS, H. B.; KISCHEL, E. ; GONZAGA, L. A. M.; BRANDÃO, D. R.; FIDELIS, R. R.; Eficiência agrônômica no uso de nitrogênio mineral por cultivares de arroz de terras altas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.6, n.4, p.650-656, out.-dez., 2011.
- CAO, D., GAO, X., LIU, J., WANG, X., GENG, S., YANG, C., LIU, B. & SHI, D. Root-specific DNA methylation in *Chloris virgata*, a natural alkaline-resistant halophyte, in response to salt and alkaline stresses. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 5, p. 1102-1109, 2012.
- CASTAINGS, L., MARCHIVE, C., MEYER, C., & KRAPP, A. Nitrogen signalling in Arabidopsis: how to obtain insights into a complex signalling network. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1391-1397, 2011
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, 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.; TILLARD, P.; FILLEUR, S.; MUNOS, S.; DANIEL - VEDELE, F.; GOJON, A. Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.127, p.262- 271, 2001.
- CHARDON, F., NOËL, V., & MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Exploring NUE in crops and in Arabidopsis ideotypes to improve yield and seed quality. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 9, p. 3401-3412, 2012.
- CHIU, C. C., LIN, C. S., HSIA, A. P., SU, R. C., LIN, H. L., & TSAY, Y. F. Mutation of a nitrate transporter, AtNRT1: 4, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 9, p. 1139-1148, 2004.
- CLAASSEN, N.; BARBER, S. A. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into root of intact plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 54, n. 4, p. 564-568, 1974.
- CLARKSON, D. T. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 36, n. 1, p. 77-115, 1985.
- CRUZ, C. D., & CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Vol. 2. Ed. UFV, 2006.
- DECHORGNAT, J., NGUYEN, C. T., ARMENGAUD, P., JOSSIER, M., DIATLOFF, E., FILLEUR, S., & DANIEL-VEDELE, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1349-1359, 2011.

- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichloroisocyanurate color reaction. **Anal. Chem.**, v.49, p. 1080-1080, 1977
- FERNANDES, M. S. N carriers, light and temperature influences on the free amino acid pool composition of rice plants. **Turrialba**, v.33, n.3, p.297-301, 1984.
- FERREIRA, D. F. Análise estatística por meio do SISVAR (Sistema para Análise de Variância) para Windows versão 4.0. In: **Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria**, 45, 2000, São Carlos. Anais...São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258
- FERREIRA, M. E e GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª ed. **Brasília: EMBRAPA – CENARGEN**, 1998. 220p.
- FIDELIS, R. R.; ROTILI, E. A.; SANTOS, M. M; BARROS, H. B.; MELO, A. V.; DOTTO, M. Eficiência no uso de nitrogênio em cultivares de arroz irrigado. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, ISSN (on line): 1981-0997, v.6, n.4, p.622-626, out.-dez., 2011, Recife, PE, UFRPE.
- FILLEUR, S.; DORBE, M.-F.; CERZO, M.; ORSEL, M.; GRANIER, F.; GOJON, A.; DANIEL-VEDELE, F. An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. **FEBS Letter**, v.489, p.220-224, 2001.
- GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids, **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.185a-185i, 2001.
- GOUVEIA, M. E. Análise do padrão de metilação em genes supressores de tumor na Leucemia Mielóide Crônica (Dissertação) – **Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2007.
- GUO, C., CHANG, W., GU, J., LI, X., LU, W., & XIAO, K. Molecular characterization, transcriptional regulation and function analysis of nitrate transporters in plants. **Frontiers of Agriculture in China**, v. 5, n. 3, p. 291-298, 2011.
- H.P. KOU; Y. LI; X.X. SONG; X.F. OUA; S.C. XING; J. MA; D. VON WETTSTEIND; B. LIU. Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa L.*). **Journal of Plant Physiology** 168 (2011) 1685– 1693. doi:10.1016/j.jplph.2011.03.017
- HO, C.H.; LIN, S.H.; HU, H.C.; TSAY, Y.F. CHL1 Functions as a Nitrate Sensor in Plants. **Cell**, v.38, p.1184–1194, 2009
- HOAGLAND, D. R., ARNON, D. I., “The Water-Culture Method for Growing Plants Without Soil”, **California Agr. Expt. Sta. Circ.** 347 (revised), 1950.
- HUANG, N. C., LIU, K. H., LO, H. J., & TSAY, Y. F. Cloning and functional characterization of an Arabidopsis nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. **The Plant Cell Online**, v. 11, n. 8, p. 1381-1392, 1999.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin Society Vaud Science Natural**, v.44, p.223–270, 1908.
- KANT, S., BI, Y. M., & ROTHSTEIN, S. J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 4, p. 1499-1509, 2011.
- KARAN, R., DELEON, T., BIRADAR, H., & SUBUDHI, P. K. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. **PLoS one**, v. 7, n. 6, p. e40203, 2012.

- KIMATU, J. N., JIANG, L., NGEZAHAYO, F., SONGDI, C., QUAN-YUAN, Y., PANG, J., & LIU, B. Alteration in cytosine DNA methylation patterns and levels induced by aluminium toxicity stress in maize varieties. **International Journal of Modern Agriculture**, Vol 2, No.1, 2013
- KIRK, G. J. D.; KRONZUCKER, H. J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: Modeling study. **Annals of Botany**, v.96, p.639-646, 2005.
- KONG, L., WANG, F., LÓPEZ-BELLIDO, L., GARCIA-MINA, J. M., & SI, J. Agronomic improvements through the genetic and physiological regulation of nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Plant Biotechnology Reports**, p. 1-11, 2013.
- KOTUR, Z., MACKENZIE, N., RAMESH, S., TYERMAN, S. D., KAISER, B. N., & GLASS, A. D. Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2. 1. **New Phytologist**, v. 194, n. 3, p. 724-731, 2012
- KOTUR, Z., MACKENZIE, N., RAMESH, S., TYERMAN, S. D., KAISER, B. N., & GLASS, A. D. Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2. 1. **New Phytologist**, v. 194, n. 3, p. 724-731, 2012.
- KRAISER, T., GRAS, D. E., GUTIÉRREZ, A. G., GONZÁLEZ, B., & GUTIÉRREZ, R. A. A holistic view of nitrogen acquisition in plants. **Journal of experimental botany**, v. 62, n. 4, p. 1455-1466, 2011.
- LATZEL, V.; ZHANG, Y.; MORITZ, K. K.; FISCHER, M.; BOSSDORF, O. Epigenetic variation in plant responses to defence hormones. **Annals of Botany**, 2012. Disponível em: www.aob.oxfordjournals.org, doi:10.1093/aob/mcs088
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**. 2001, 25, 402.
- MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p.250-258, 2009.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C., DANIEL-VEDELE, F., DECHORGNAT, J., CHARDON, F., GAUFICHON, L., & SUZUKI, A. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. **Annals of Botany**, v. 105, n. 7, p. 1141-1157, 2010.
- MENGEL, D. B., & BARBER, S. A. Rate of nutrient uptake per unit of corn root under field conditions. **Agronomy Journal**, v. 66, n. 3, p. 399-402, 1974.
- MILLER, A.J., FAN, X., SHEN, Q., AND SMITH, S.J. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. **Journal of Experimental Botany** . v. 59, p.111–119, 2008.
- MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide** 2001, 5, 62-71.
- MIROUZE, M.; PASZKOWSKI, J. Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. **Current Opinion in Plant Biology** 2011, 14:267–274 DOI 10.1016/j.pbi.2011.03.004
- MULLER, H.R.; PRADO, K.B. Epigenética: um novo campo da genética. **RUBS**, Curitiba, v.1, n.3, p.61-69, set./dez. 2008
- MUÑOS, S.; CAZETTES, C.; FIZAMES, C, GAYMARD, F, TILLARD, P, LEPETIT, M, LEJAY, L, GOJON, A. 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**, v. 16, p. 2433-2447, 2004.

- ORSEL, M., KRAPP, A., & DANIEL-VEDELE, F. Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression. **Plant physiology**, v. 129, n. 2, p. 886-896, 2002.
- OU, X., ZHANG, Y., XU, C., LIN, X., ZANG, Q., ZHUANG, T., JIANG, L., VON WETTSTEIN, D. & LIU, B. Transgenerational inheritance of modified DNA methylation patterns and enhanced tolerance induced by heavy metal stress in rice (*Oryza sativa* L.). **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e41143, 2012.
- PLETT, D., TOUBIA, J., GARNETT, T., TESTER, M., KAISER, B. N., & BAUMANN, U. Dichotomy in the NRT gene families of dicots and grass species. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15289, 2010.
- QIN, F. J., SUN, Q. W., HUANG, L. M., CHEN, X. S., & ZHOU, D. X. Rice SUVH histone methyltransferase genes display specific functions in chromatin modification and retrotransposon repression. **Molecular plant**, v. 3, n. 4, p. 773-782, 2010.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>, 2011.
- REMANS, T., NACRY, P., PERVENT, M., GIRIN, T., TILLARD, P., LEPETIT, M., GOJON, A. A central role for the nitrate transporter NRT2.1 in the integrated morphological and physiological responses of the root system to nitrogen limitation in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 140, p.909–921. 2006.
- RUIZ, H. A.; FERNANDES FILHO, E. I. Cinética: software para estimar as constantes $V_{m\acute{a}x}$ e K_M da equação de Michaelis-Menten. In: Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, n.10., 1992, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 124- 25. (Série Técnico-Científica, 180).
- RUIZ-GARCÍA, L.; CABEZAS, J. A.; MARÍA, N.; CERVERA, M. T. Isoschizomers and Amplified Fragment Length Polymorphism for the detection of specific cytosine methylation changes. In: **Plant Epigenetics Methods and Protocols**. Humana Press, 2010. p. 63-74.
- SANTOS, L. A., BUCHER, C. A., DE SOUZA, S. R., & FERNANDES, S. Metabolismo de nitrogênio em arroz sob níveis decrescentes de nitrato. **Agronomia**, v.39, n°.1-2, p.28 - 33, 2005
- SAZE, H.; TSUGANE, K.; KANNO, T.; NISHIMURA, T. DNA Methylation in Plants: Relationship to Small RNAs and Histone Modifications, and Functions in Transposon Inactivation. **Plant Cell Physiol**. 53(5): 766–784 (2012) doi:10.1093/ pcp/pcs008
- SHI, W. M., XU, W. F., LI, S. M., ZHAO, X. Q., & DONG, G. Q. Responses of two rice cultivars differing in seedling-stage nitrogen use efficiency to growth under low-nitrogen conditions. **Plant and soil**, v. 326, n. 1-2, p. 291-302, 2010.
- SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxonomy**, Berlin, v.11, p.33-40, 1962.
- SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogênio. In Nutrição Mineral de Plantas. Ed. Fernandes, pag. 15-18, 22-26. Local: Viçosa – MG, Brasil, 2006.
- TEDESCO, M. J. Extração Simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecidos de plantas por digestão com $H_2O_2.H_2SO_4$. UFRGS. 1983.23p
- TAKAYANAGI, S., TAKAGI, Y., ARAKI, R., & HASEGAWA, H. High-affinity nitrate uptake by rice (*Oryza sativa*) coleoptiles. **Journal of plant research**, v. 124, n. 2, p. 305-309, 2011.

- WANG WS, PAN YJ, ZHAO XQ, DWIVEDI D, ZHU LH, ALI J, FU BY, LI ZK. Drought-induced site-specific DNA methylation and its association with drought tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Experimental Botany** 62, 1951–1960, 2011.
- WANG, Y. Y., HSU, P. K., & TSAY, Y. F. Uptake, allocation and signaling of nitrate. **Trends in plant science**, v. 17, n. 8, p. 458-467, 2012.
- XIAO S, XIE D, CAO X, YU P, XING X, CHEN CC, MUSSELMAN M, XIE M, WEST FD, LEWIN HA, WANG T, ZHONG S. Comparative epigenomic annotation of regulatory DNA. **Cell** 149(6): 1381-1392. 2012.
- XU, G., FAN, X., & MILLER, A. J. Plant nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual review of plant biology**, v. 63, p. 153-182, 2012.
- YAN, H., KIKUCHI, S., NEUMANN, P., ZHANG, W., WU, Y., CHEN, F., & JIANG, J. Genome-wide mapping of cytosine methylation revealed dynamic DNA methylation patterns associated with genes and centromeres in rice. **The Plant Journal**, v. 63, n. 3, p. 353-365, 2010.
- YAN, M., FAN, X., FENG, H., MILLER, A. J., SHEN, Q., & XU, G. Rice OsNAR2. 1 interacts with OsNRT2.1, OsNRT2.2 and OsNRT2.3a nitrate transporters to provide uptake over high and low concentration ranges. **Plant, Cell & Environment**, v. 34, n. 8, p. 1360-1372, 2011.
- YEMM, E. W. & COCKING, E. C. The determination of amino-acid with ninhydrin. **Analytical Biochemistry**, 80:209-213, 1955.
- YEMM, E. W. & WILLIS, A. I. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochem. J.**, 57:508-514, 1957.
- YU, Y., YANG, X., WANG, H., SHI, F., LIU, Y., LIU, J., LI, L., LI, L., WANG, D. & LIU, B. Cytosine methylation alteration in natural populations of *Leymus chinensis* induced by multiple abiotic stresses. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e55772, 2013.
- ZHANG, N.; GIBON, Y.; GUR, A.; CHEN, C.; LEPAK, N.; HOHNE, M.; ZHANG, Z.; KROON, D.; TSCHOEP, H.; STITT, M.; BUCKLER, E. Fine quantitative trait loci mapping of carbon and nitrogen metabolism enzyme activities and seedling biomass in the maize IBM mapping population. **Plant Physiology**. v. 154, p. 1753-1765, 2010.
- ZHAO, Y., ZHOU, D.-X., Epigenomic Modification and epigenetic regulation in rice. **Journal of Genetics and Genomics** (2012) ,doi:10.1016/j.jgg. 2012.02.009
- ZHENG, X., CHEN, L., LI, M., LOU, Q., XIA, H., WANG, P., LI, T., LIU, H. & LUO, L. Transgenerational variations in DNA methylation induced by drought stress in two rice varieties with distinguished difference to drought resistance. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80253, 2013.
- ZHONG L, XU YH, WANG JB. 2009. DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. **African Journal of Biotechnology** 8,6201–6207.

7 ANEXO

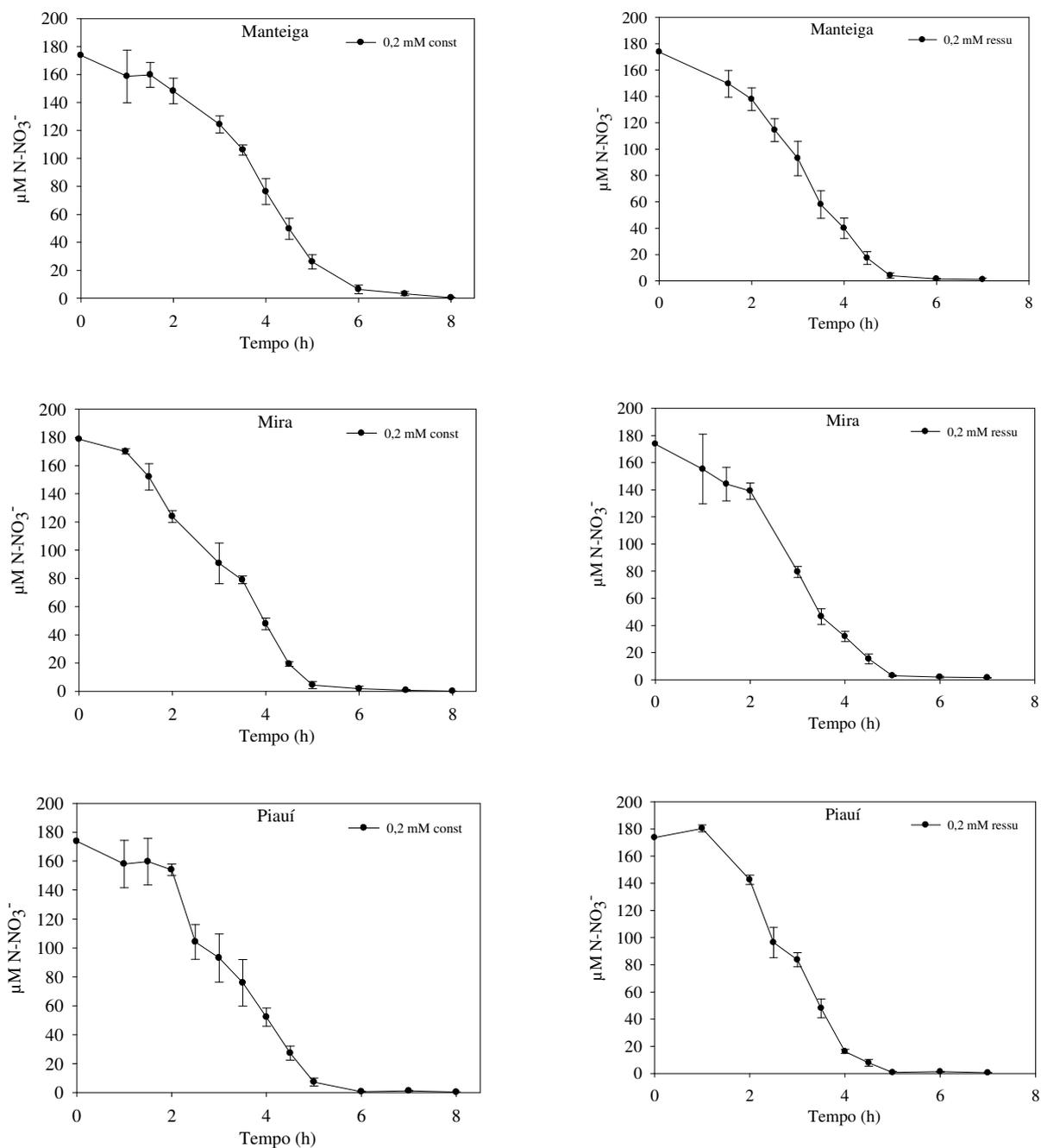


Figura 16. Curvas de depleção de nitrato das variedades Manteiga, Mira e Piauí cultivada durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os tratamentos: $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ constante e ressurgimento com $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ após 72 h de deficiência.

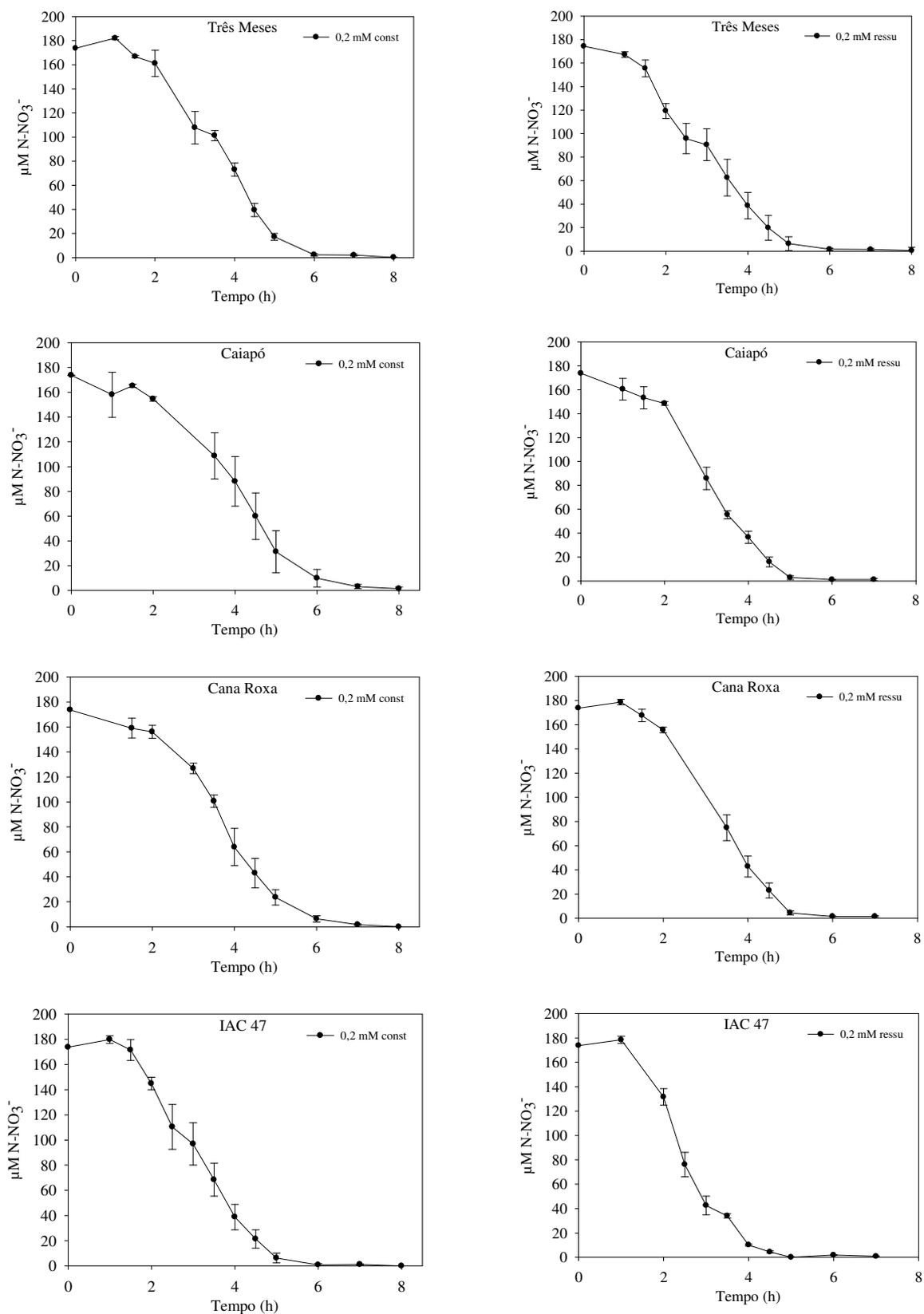


Figura 17. Curvas de depleção de nitrato das variedades Três Meses, Caiapó, Cana Roxa, IAC 47 cultivadas durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução contendo os tratamentos: 0,2 mmol L⁻¹ constante e ressuprimento com 0,2 mmol L⁻¹ após 72 h de deficiência.

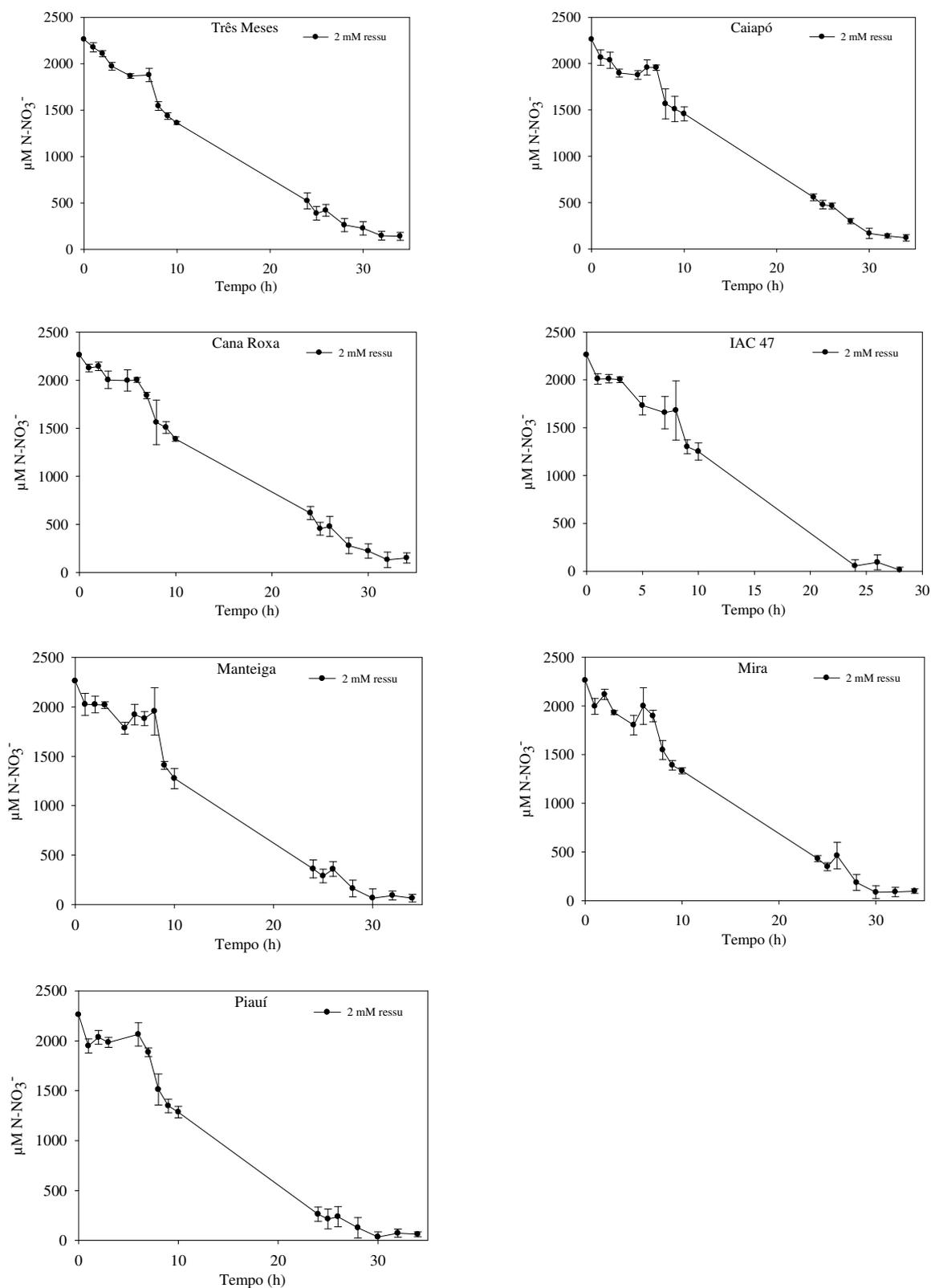


Figura 18. Curvas de depleção de nitrato das variedades Três Meses, Caiapó, Cana Roxa, IAC 47, Manteiga, Mira e Piauí cultivada durante vinte e dois dias em câmara de crescimento em solução com ressurgimento de 2 mM N-NO₃⁻ após 72 h de deficiência.

Tabela 12. Teores de nitrato, amônio, N-amino, porcentagem de açúcares solúveis, N-proteico e N-total em folhas das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

	Caiapó	IAC 47	Manteiga	Piauí
Nitrato				
0,2 mM const	3,67 a	3,87 a	3,46 a	5,55 a
2 mM const	12,74 a	12,19 a	11,82 a	11,33 a
Amônio				
0,2 mM const	0,00 b	0,50 b	1,27 a	1,43 a
2 mM const	0,00 b	0,80 ab	1,58 a	0,94 ab
N- Amino				
0,2 mM const	17,65 ab	10,93 b	20,10 a	23,86 a
2 mM const	24,00 a	17,13 b	22,60 a	11,05 b
Açúcares Solúveis				
0,2 mM const	1,17 a	0,63 b	1,06 a	1,22 a
2 mM const	2,34 a	1,55 a	1,61 a	1,47 a
N- total				
0,2 mM const	2,69 a	2,34 a	3,08 a	2,33 a
2 mM const	3,31 b	3,78 a	3,41 ab	3,35 b
N- total Reduzido				
0,2 mM const	20,34 bc	13,77 c	24,46 ab	27,63 a
2 mM const	27,31 a	21,72 ab	27,59 a	15,34 b

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 13. Teores de nitrato, N-amino, porcentagem de açúcar, N-total e N-total reduzido em bainha das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

	Caiapó	IAC 47	Manteiga	Piauí
Nitrato				
0,2 mM const	1,97 b	1,44 b	5,25 a	4,76 a
2 mM const	32,21 a	44,06 a	35,48 a	39,47 a
N- Amino				
0,2 mM const	8,83 ab	7,26 b	5,54 b	12,44 a
2 mM const	11,99 ab	11,52 ab	13,64 a	9,56 b
Açúcares Solúveis				
0,2 mM const	0,49 a	0,52 a	0,53 a	0,50 a
2 mM const	0,77 ab	0,71 b	0,90 a	0,68 b
N total				
0,2 mM const	0,96 a	1,03 a	0,73 a	0,85 a
2 mM const	1,07 a	1,02 a	1,28 a	1,33 a
N total Reduzido				
0,2 mM const	9,79 ab	8,29 b	6,27 b	13,29 a
2 mM const	13,06 ab	12,54 ab	14,92 a	10,89 b

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 14. Teores de nitrato, N-amino, porcentagem de açúcar, N-total e N-total reduzido em raízes das variedades de arroz IAC 47, Piauí, Caiapó e Manteiga, submetidas a dois tratamentos com nitrato: 0,2 mM e 2 mM constante, coletadas no 21° DAG após seis horas da troca de solução nutritiva.

	Caiapó	IAC 47	Manteiga	Piauí
Nitrato				
0,2 mM const	10,26 ab	5,89 b	12,45 a	10,22 ab
2 mM const	36,54 ab	35,82 ab	46,50 a	28,55 b
N- Amino				
0,2 mM const	7,37 bc	6,18 c	8,38 ab	8,88 a
2 mM const	11,79 a	8,28 a	9,99 a	9,04 a
Açúcares Solúveis				
0,2 mM const	0,43 ab	0,40 ab	0,54 a	0,28 b
2 mM const	0,54 a	0,30 a	0,46 a	0,33 a
N- Total				
0,2 mM const	1,61 a	1,48 a	0,90 b	1,65 a
2 mM const	1,48 a	1,51 a	1,45 a	1,67 a
N- total Reduzido				
0,2 mM const	8,98 b	7,65 c	9,28 b	10,53 a
2 mM const	13,26 a	9,79 a	11,44 a	10,71 a

*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey, $p < 0,05$).