

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**Remobilização de Nitrogênio em Variedades de
Arroz com e sem Suplementação Nitrogenada**

Cassia Pereira Coelho

2011



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

**REMOBILIZAÇÃO DE NITROGÊNIO EM VARIEDADES DE
ARROZ COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO NITROGENADA**

CASSIA PEREIRA COELHO

Sob a Orientação do Professor
Manlio Silvestre Fernandes

e Co-orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

633.18
C672r
T
Coelho, Cássia Pereira, 1984-
Remobilização de nitrogênio em
variedades de arroz com e sem
suplementação nitrogenada / Cássia Pereira
Coelho. - 2011.
69 f.: il.

Orientador: Manlio Silvestre Fernandes.
Dissertação (mestrado)- Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Agronomia.
Bibliografia: f.48-54.

1. Arroz - Cultivo - Teses. 2. Arroz -
Nutrição - Teses. 3. Arroz - Análise -
Teses. 4. Nitrogênio na agricultura -
Teses. I. Fernandes, Manlio Silvestre,
1939- . II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Agronomia. III. Título.

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

CASSIA PEREIRA COELHO

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 22/02/2011

Manlio Silvestre Fernandes. Ph.D. UFRRJ
(Orientador)

Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior. Dr. UEMA

Luiz Mors Cabral. Dr. UFF

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Manoel Venceslau (in memoriam), que foi o alicerce para meu crescimento.

Às minhas mães Janete e Maria pelo amor, apoio e incentivo e aos meus irmãos pela constante companhia e ajuda em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida;

Às minhas mães Janete Vanda e Maria Augusta pelo carinho, apoio e por terem acreditado em mim;

À Kátia, minha irmã, amiga e companheira em todos os momentos e aos meus irmãos Cassius e Kallynadjá pela constante presença;

Ao meu padrasto Wanderley por sempre estar disposto a ajudar;

Aos meus tios Edílson, Edmilson, Gilson, e Juarez pelo carinho e motivação;

Ao professor Manlio Silvestre Fernandes pela carinhosa orientação, valiosos ensinamentos e grande oportunidade que me concedeu ao aceitar meu ingresso em seu grupo de pesquisa;

À professora Sonia Regina de Souza pelas contribuições para a realização deste trabalho e pelo apoio nesses dois anos de convivência;

Ao professor Leandro Azevedo pelo apoio e incentivo;

Aos amigos Marcus Loss, Maria Luciene, Rafaela Eloi, Carlos Bucher, Leandro Martins, Vinicius Miranda, Renata e Rafael Passos pela amizade, ajuda, afeto e alegrias compartilhadas;

À Mariam, Natália e a todos os estudantes do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas pelo companheirismo, amizade e ajuda em coletas e análises;

Ao CPGA-CS e sua coordenação pelo apoio para a realização do trabalho;

A CAPES, FAPERJ e ao CNPq pela concessão das bolsas e financiamento do trabalho de pesquisa;

À UFRRJ pelo acolhimento e infra-estrutura;

A todos pelos momentos que passamos juntos.

Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Cassia Pereira Coelho nascida em São Luís, Maranhão, concluiu o ensino fundamental na Unidade Integrada Anna Adelaide Bello - SESI e o ensino médio no Centro de Ensino Médio Paulo Freire, ambos em sua cidade de origem. Em 2002, ingressou no curso de graduação em Agronomia da UEMA. Durante a graduação, foi monitora da disciplina de Bioquímica durante os anos de 2006 e 2007 e bolsista por três anos do CNPq, no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da UEMA, trabalhando com sistemas agroflorestais sob orientação do professor Altamiro Souza de Lima Ferraz Júnior. Obteve o título de Engenheira Agrônoma em 2008. Em março de 2009, ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, na UFRRJ, sob orientação do Prof. Manlio Silvestre Fernandes. Foi bolsista CAPES durante o primeiro ano do mestrado e no segundo ano do curso, bolsista nota 10 da FAPERJ.

RESUMO

COELHO, Cassia Pereira Coelho. **Remobilização de nitrogênio em variedades de arroz com e sem suplementação nitrogenada**. 2011. 54f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Variedades locais de arroz do Maranhão são adaptadas a condições de baixa disponibilidade de N e, portanto, podem ser mais eficientes no uso desse nutriente quando comparadas a variedades melhoradas. Essa eficiência pode em parte ser devido à estratégia de acúmulo e remobilização do N das partes vegetativas para os grãos. Este trabalho teve como objetivo avaliar a contribuição da remobilização na Eficiência de Uso de Nitrogênio (EUN) em quatro variedades de arroz. Dentre elas uma é melhorada, a IAC 47, e três são variedades locais: Piauí, Bico Ganga e Revenda, originárias de cultivos com baixa disponibilidade de nutrientes no estado do Maranhão. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Foram usados potes contendo 9 kg de terra, proveniente dos primeiros 20 cm de solo coletado em área no município de Pinheiral – RJ, classificado como Chernossolo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 x 4 (variedades x doses de N x coletas) com quatro repetições. Os vasos receberam adubação basal, no plantio, em dose equivalente a 60 kg de N/ha na forma de Uréia. Na antese as plantas receberam ou não adubação suplementar com uréia em dose equivalente a 40 kg de N/ha. Foram realizadas quatro coletas: no período do emborrachamento (15 dias antes da antese - DAA), na antese, 15 dias após antese (DAA) e ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas. Foram avaliados os teores de N-amino livre, $N-NH_4^+$, $N-NO_3^-$ e açúcares solúveis nas folhas, raízes e bainhas das plantas da primeira coleta realizada. Foram determinadas as atividades das enzimas nitrato redutase e glutamina sintetase nas amostras provenientes da primeira, segunda e terceira coletas e a produção de massa seca das plantas. As expressões dos genes das isoformas de glutamina sintetase: OsGS1.1, OsGS2 e OsGS1.3 foram analisadas nas folhas bandeira, folhas 2 e panícula das variedades IAC-47 e Piauí nas três primeiras coletas. Os resultados obtidos indicam uma estratégia da variedade Piauí em acumular o N nos períodos iniciais do ciclo de desenvolvimento com maior eficiência que a variedade melhorada IAC-47, demonstrando uma maior eficiência de remobilização de N.

Palavras-chave: Eficiência de remobilização de nitrogênio (ERN). *Oryza sativa*. Eficiência de uso de nitrogênio (EUN).

ABSTRACT

COELHO, Cassia Pereira Coelho. **Nitrogen remobilization in rice varieties with and without additional nitrogen fertilization.** 2011. 54p. Dissertation (Master Science in Agronomy, Soil Science) Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

This study aimed to evaluate the contribution of nitrogen remobilization for Nitrogen Use Efficiency (NUE) in four rice varieties. IAC-47 represent an improved variety, and Piauí, Bico Ganga and Revenda are three local varieties from State of Maranhão (Brazil), cultivated in systems with low N input. Local rice varieties in Maranhão State are adapted to conditions of low N levels and therefore may be more efficient in the usage of this nutrient compared to improved varieties. This efficiency may be partly due to the strategy of accumulation and remobilization of N from vegetative parts to grains. The experiment was conducted in a greenhouse at Soils Department of the Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). The plants were cultured in pots containing 9 kg of soil from upper 20 cm of a Molisol, from Pinheiral – RJ. The experimental design was completely randomized in a factorial 4 x 2 x 4 (varieties x N levels x harvest) with four replications. The soil in the pots was fertilized at planting with a dose equivalent to 60 kg N ha⁻¹ of urea. In the flowering stage, the plants received or not supplemental fertilization with urea, at a dose equivalent to 40 kg N ha⁻¹. Four harvests were taken: 15 days before anthesis, anthesis, 15 days after anthesis, and at the end of plant development. There were evaluated contents of free amino-N, N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ and soluble sugars in the roots and sheaths of the plants of the first harvest. In addition it was determined the activity of nitrate reductase and glutamine synthetase in samples of the first, second and third harvests, and plant dry matter production. Expression of *OsGS1.1*, *OsGS2* and *OsGS1.3* was analyzed in the flag leaves, second leaves and panicles of two varieties (IAC-47 and Piauí) in the first three harvests. The results indicate a strategy of the Piauí variety in accumulating N at vegetative stage and remobilize at anthesis and pós-anthesis, demonstrating major efficiency of N remobilization.

Key words: Remobilization efficiency of nitrogen (RNS). *Oryza sativa*. Nitrogen efficiency use (NUE).

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do cultivo das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no início do experimento) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese). 7
- Figura 2.** Coletas das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no início do experimento) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese). 8
- Figura 3.** Massa seca da parte aérea das variedades de arroz: IAC47 (tradicional), Revenda, Piauí e Bico Ganga (locais) nas coletas realizadas aos 15 dias antes da antese (15DAA), antese, 15 dias depois da antese (DDA) – tratamento com 60 kg/ha de N, 15 dias depois da antese (DDA) – tratamento com 60+40 kg/ha de N, final do ciclo – tratamento com 60 kg/ha de N e final do ciclo – tratamento com 60 + 40 kg/ha de N. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem com relação à interação variedade x tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 13
- Figura 4.** Relação parte aérea: raiz ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças entre variedades e letras minúsculas nas colunas indicam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 14
- Figura 5.** Massa seca das panículas e raízes no final do ciclo de desenvolvimento das plantas de arroz das variedades locais do estado do Maranhão (Píauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas à adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e com ou sem adubação suplementar de 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 14
- Figura 6.** Atividade da nitrato redutase aos 15 dias antes da antese (15DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (DDA) em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) a dois tratamentos: *Tratamento 1*(T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. 16
- Figura 7.** Teores de Nitrato aos 15 dias após a antese (DAA) observado em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal na época do plantio com 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 18
- Figura 8.** Conteúdo de Nitrato (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes

- das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. 19
- Figura 9.** Acúmulo de nitrato em g/ha aos 15 dias antes da antese (DAA) observado em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N. no plantio..... 20
- Figura 10.** Teores de N-amino livre observados aos 15 dias antes a antese (DAA) em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 22
- Figura 11.** Teores de N-amino livre observados na antese em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 23
- Figura 12.** Teores de N-amino livre aos 15 dias depois da antese (DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 24
- Figura 13.** Conteúdo de N-amino (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. 26
- Figura 14.** Teores de N-NH₄⁺ observados aos 15 dias antes da antese (DAA) em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas à adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade..... 27
- Figura 15.** Conteúdo de N-NH₄⁺ (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. 28
- Figura 16.** Teores de açúcares observados aos 15 dias antes da antese (DAA) em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com

- 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 30
- Figura 17.** Teores de açúcares solúveis na antese em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 31
- Figura 18.** Teores de açúcares solúveis aos 15 dias depois da antese (DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 32
- Figura 19.** Conteúdo de açúcares (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. 33
- Figura 20.** Teor de proteína nos grãos no final do ciclo de desenvolvimento nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 35
- Figura 21.** (A) Índice de colheita de N (N grãos/N total da parte aérea), (B) Eficiência de utilização de N (produção de espiguetas/conteúdo de N na parte aérea), (C) Eficiência de absorção de N (conteúdo de N na parte aérea/N fornecido) e (D) Eficiência de Uso de N (produção de espiguetas/N fornecido) das quatro variedades no final do ciclo de desenvolvimento das plantas. Letras maiúsculas diferem entre variedades entre colunas e letras minúsculas entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 37
- Figura 22.** Atividade de GS observada aos 15 DAA em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 38
- Figura 23.** Atividade de GS no período da antese observada em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC-47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. 39
- Figura 24.** Atividade de GS aos 15 DDA nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade

melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: <i>Tratamento 1</i> (apenas adubação basal com 60 kg N ha ⁻¹ no momento do plantio) e <i>Tratamento 2</i> (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha ⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.....	40
Figura 25. Expressão dos genes <i>OsGSI.1</i> , <i>OsGS2</i> e <i>OsGSI.3</i> aos 15 DAA e no período da antese observada em diferentes partes das plantas da variedade local de arroz do estado do Maranhão Piauí e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio.....	42
Figura 26. Expressão dos genes <i>OsGSI.1</i> , <i>OsGS2</i> e <i>OsGSI.3</i> aos 15 DDA nas diferentes partes das plantas da variedades local de arroz do estado do Maranhão Píauí e da variedade melhorada IAC-47 submetidas a dois tratamentos: <i>Tratamento 1</i> (apenas adubação basal com 60 kg N ha ⁻¹ no momento do plantio) e <i>Tratamento 2</i> (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha ⁻¹ na antese	43
Figura 27. Conteúdo de N-total na parte aérea (PA) e grãos das plantas nas coletas realizadas na antese e ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: <i>Tratamento 1</i> (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha ⁻¹ no momento do plantio) e <i>Tratamento 2</i> (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha ⁻¹ na antese.....	44
Figura 28. Absorção de N pós-antese (conteúdo de N na parte aérea no final do ciclo de desenvolvimento – conteúdo de N na antese) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: <i>Tratamento 1</i> (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha ⁻¹ no momento do plantio) e <i>Tratamento 2</i> (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha ⁻¹ na antese.....	45
Figura 29. Remobilização de N para grãos (N-total na antese – N total da palha no final do ciclo) ao final do ciclo de desenvolvimento nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: <i>Tratamento 1</i> (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha ⁻¹ no momento do plantio) e <i>Tratamento 2</i> (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha ⁻¹ na antese.....	46
Figura 30. Eficiência de Remobilização de N (remobilização de N para os grãos/N na antese) ao final do ciclo de desenvolvimento nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: <i>Tratamento 1</i> (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha ⁻¹ no momento do plantio) e <i>Tratamento 2</i> (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha ⁻¹ na antese.	46

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores (primers) <i>forward</i> e <i>reverse</i> para análises por PCR em tempo real dos genes das isoformas de glutamina sintetase citossólica (<i>OsGS1.1</i> e <i>1.3</i>) e plastidial (<i>OSGS2</i>) de arroz e gene controle da actina (<i>OsActin</i>).....	9
Tabela 2. Peso de grãos (g/vaso) e conteúdo de N na parte aérea e grãos (mg/vaso) ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a apenas à adubação basal com 60 kg N ha ⁻¹ no momento do plantio) ou a adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha ⁻¹ na antese.	34

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	Variedades Locais de Arroz do Estado do Maranhão.....	2
2.2	Eficiência de Uso de Nitrogênio	2
2.3	Relações Entre o Metabolismo de N e a EUN	3
3	MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1	Condução do Experimento.....	7
3.2	Análise da Produção de Massa Seca e N-total.....	8
3.3	Análise das Frações Solúveis.....	8
3.4	Avaliação da Expressão Gênica.....	9
3.4.1	Extração de RNA total	9
3.4.2	Síntese de cDNA e PCR em tempo real	9
3.5	Atividades Enzimáticas.....	10
3.5.1	Atividade de glutamina sintetase	10
3.5.2	Atividade de nitrato redutase	10
3.6	Parâmetros Associados à Eficiência de Uso de Nitrogênio.....	10
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
4.1	Produção de Massa Seca.....	12
4.2	Metabolismo das Plantas de Arroz	14
4.3	Eficiência de Uso de N das Variedades de Arroz	33
4.4	Atividade de Glutamina Sintetase.....	37
4.5	Expressão dos Genes <i>OsGS1.1</i> , <i>OsGS2</i> e <i>OsGS1.3</i> ao Longo do Ciclo de Desenvolvimento das Plantas.....	41
4.6	Remobilização de Nitrogênio	43
5	CONCLUSÕES	47
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

O arroz é um cereal de grande importância na dieta de populações de baixa renda, constituindo uma importante fonte de proteína. Segundo a CONAB (2011) a área cultivada com arroz na safra brasileira de 2010/11 é de 2.866,2 mil hectares, sendo que a produção nacional de arroz deve alcançar 13.135,1 mil toneladas, 12,6% maior que a safra 2009/10.

No Brasil, uma grande parte da produção de arroz é desenvolvida por pequenos produtores em uma agricultura de baixo uso de fertilizantes nitrogenados. O desenvolvimento de variedades de arroz com capacidade de absorver e utilizar N mais eficientemente torna-se uma alternativa para o aumento da produção nesse tipo de cultivo e para a diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados em sistemas onde o seu uso é intensivo, o que levaria a diminuição dos custos de produção e riscos ambientais.

Estudos evidenciam que variedades locais de arroz do estado do Maranhão são adaptadas a condições de baixa disponibilidade de N e, portanto, podem ser mais eficientes na assimilação e uso desse nutriente quando comparadas a variedades melhoradas. Esta eficiência pode em parte ser devido à capacidade de acúmulo e remobilização do N das partes vegetativas para os grãos.

Segundo CHARDON et al. (2010) a Eficiência de Uso de Nitrogênio (EUN) tem sido definida para cultivos como a produção de grãos por unidade de N disponível a partir do solo, incluindo fertilizantes nitrogenados.

A remobilização de nitrogênio é um passo chave para melhorar a EUN (MICKELSON et al., 2003; MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008). Quando se inicia o processo de senescência das folhas há uma intensiva degradação de proteínas, em especial as fotossintéticas, que servem como fonte de N que posteriormente será remobilizado para os órgãos em desenvolvimento, em especial grãos e folhas novas. Segundo MAXCLAUX et al. (2001) a contribuição da remobilização de N da folha para grãos em arroz, trigo e milho é uma característica genética e pode variar de 50 a 90%.

ARAÚJO (2010), em trabalho utilizando técnica de RAPD para verificar similaridade genética entre variedades de arroz, observou que as variedades IAC-47, Revenda, Piauí e Bico-ganga estavam no mesmo grupo de similaridade genética, ficando divididas em diferentes subgrupos. Ainda, apesar das variedades IAC-47 e Revenda terem pertencido ao mesmo agrupamento de similaridade genética e terem tamanhos de grãos e relações comprimento largura semelhantes, apresentaram apenas 65% de similaridade genética.

Com base nessas informações o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a contribuição da remobilização de nitrogênio para a eficiência de uso de nitrogênio em quatro variedades de arroz. Dentre elas, uma variedade melhorada (IAC-47) para agricultura de alto insumo e três variedades locais do estado do Maranhão (Revenda, Piauí e Bico-ganga) cultivadas por pequenos agricultores em sistemas com baixa disponibilidade de nutrientes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Variedades Locais de Arroz do Estado do Maranhão

O arroz (*Oryza sativa L.*) é uma das culturas agrícolas mais importantes, alimenta mais da metade da população mundial e fornece vários subprodutos (RODRIGUES & ANDO, 2002). No Maranhão encontra-se um grande número de variedades locais de arroz, e esses germoplasmas tradicionais, com sua grande variabilidade genética, constituem fonte de recursos genéticos de inestimável valor para os programas de melhoramento de arroz no País (FONSECA et al., 1982). Torna-se importante o estudo dessas variedades locais, a fim de se elucidar os mecanismos envolvidos na tolerância a estresses ambientais (como déficit hídrico e Al^{+3}) e eficiência de uso de nutrientes (SOUZA et al., 1998).

As variedades de arroz apresentam diferentes respostas ao nitrogênio em termos de seu acúmulo e redistribuição na matéria seca (JIANG et al., 1995; BUFOGLE et al., 1997; SOUZA et al., 1998, JIANG et al., 2004). Segundo SOUZA et al. (1998), a variedade local de arroz Piauí foi mais eficiente na utilização do N acumulado e, portanto menos dependente de suplementação externa desse nutriente no período de enchimento dos grãos do que uma variedade melhorada.

O nitrogênio é o nutriente de maior demanda metabólica pelas plantas e um fator limitante muito importante da produtividade (TABUCHI et al., 2007). Melhorar a eficiência do uso de nitrogênio (EUN) é essencial para reduzir os custos com fertilizantes na produção de plantas e para evitar danos ambientais decorrentes da poluição e/ou eutrofização dos cursos d'água, bem como emissão de N_2O proveniente das transformações do N no solo. (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008).

2.2 Eficiência de Uso de Nitrogênio

Em informe sobre desenvolvimento agrícola e segurança alimentar de 06 de agosto de 2010 o secretário geral da ONU afirma que persiste a insegurança alimentar em 29 países do mundo e mais de 1 bilhão de pessoas seguem passando fome e desnutridas. Além disso, a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) afirmam que no decênio 2010-2019 os preços médios internacionais dos produtos básicos serão superiores aos níveis máximos alcançados em 2007-2008 do decênio anterior. Em vista desse quadro torna-se importante o aumento de produtividade dos cultivos a custos mínimos, principalmente dos cereais mais utilizados na alimentação humana.

O uso de variedades com maior Eficiência de Uso de Nitrogênio (EUN) pode ser uma estratégia economicamente positiva para a produção de cultivos de baixo valor como os cereais e, além disso, deve-se levar em consideração o benefício ambiental gerado pela diminuição do uso de fertilizantes nitrogenados para o cultivo dessas plantas. Há necessidade de aumentar a Eficiência de uso de Nitrogênio (EUN) de cultivos de cereais através de estratégias de manejo de N, métodos de melhoramento de plantas tradicionais ou biotecnologia, enquanto no mínimo mantém ou mesmo aumente a produtividade dos cultivos (BEATTY et al., 2010).

KANT et al. (2011) afirmam que a EUN pode ser dividida em duas partes, a primeira seria a eficiência de assimilação, que envolve absorção e assimilação do N e a segunda a eficiência de utilização, que envolve remobilização do N. A remobilização de N no período de enchimento de grãos é de extrema importância nas culturas de arroz e trigo; cerca de 80% do conteúdo de N nos grãos é derivado de remobilização das folhas nessas culturas (KICHEY et al., 2007; TABUCHI et al., 2007). Segundo PALTA and FILLERY (1995) e HABASH et al.

(2006) em trigo (*Triticum aestivum L.*), 60-95% do N dos grãos é advindo da remobilização do N estocados em raízes e parte aérea antes da antese.

Segundo MASCLAUX-DAUBRESSE et al. (2010) a EUN em plantas depende da disponibilidade de nitrogênio no solo e de como as plantas utilizam o nitrogênio ao longo de sua vida e segundo esses autores corresponde a proporção entre produção (N total da planta, N do grão, produção de biomassa, produção de grãos) e disponibilidade de N (N total, N do solo ou N aplicado). PATHAK et al. (2009) citam que a Eficiência de Uso de Nitrogênio em Plantas (EUN) é um fenômeno complexo que depende de um número de fatores externos e internos, incluindo disponibilidade de nitrogênio no solo, sua absorção e remobilização, carbono fotossintético, fornecimento de poder redutor, sinalização de nitrato, regulação pela luz e hormônios.

O aumento da EUN pode ser obtido através da melhoria de absorção, assimilação e remobilização de N do cultivo, no intuito de direcionar esse nutriente para aumento da produção e teor de proteína nos produtos de interesse. Segundo SWARBRECK et al. (2011) o aumento do entendimento da assimilação e remobilização de nitrogênio torna-se importante para o desenvolvimento de novas cultivares com melhor eficiência de uso de N, capazes de manter a produção apesar da diminuição do fornecimento de fertilizantes.

As mudanças no aumento da EUN incluem otimização de fornecimento de N e demanda, maximização da absorção e assimilação de N do cultivo, minimização das perdas de N e fundamentalmente, melhorias específicas na produção de biomassa, folhas, frutos ou grãos, dependendo da cultura.

2.3 Relações Entre o Metabolismo de N e a EUN

Plantas diferem na sua preferência por fontes de N, absorvendo-o primariamente em formas inorgânicas como nitrato ou amônio, via sistema radicular (WILLIAMS & MILLER, 2001). O nitrato é considerado a fonte de N mineral mais importante para o crescimento das plantas em solos bem aerados. Segundo DECHORGNAT et al. (2011) em climas temperados e em solos cultivados o nitrato é a mais importante fonte de N disponível para os cultivos e, antes de sua redução e assimilação em aminoácidos pode entrar através das células radiculares e se mover por toda a planta.

A absorção de nitrato é um processo ativo, que ocorre contra um gradiente de potencial eletroquímico, e precisa de geração de um gradiente de prótons através da membrana plasmática, sendo, portanto dependente da atividade de bombas de próton (P-H⁺-ATPase) (GLASS et al., 1992). A passagem de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) através da membrana plasmática (plasmalema) das células da epiderme e do córtex da raiz ocorre através de transportadores específicos (LARSSON & INGEMARSSON, 1989).

Segundo BREDEMEIER & MUNDSTOCK (2000) a absorção de N é modulada pela presença dos carregadores específicos, pela afinidade desses carregadores em relação ao nitrato ou amônio e pela quantidade de N presente no solo

Após a sua entrada na célula, o nitrato pode ser reduzido a nitrito (NO₂⁻), no citosol, através da enzima nitrato redutase (NR) e, logo a seguir, convertido a amônio (NH₄⁺) no plastídio, através da enzima nitrito redutase (NiR) (BREDEMEIER, C. & MUNDSTOCK, 2000). O NH₄⁺ é então incorporado em esqueletos de carbono pelo sistema enzimático GS/GOGAT (glutamina sintetase/glutamato sintase) (LEA e MIFLIN, 1974). Alternativamente, o NO₃⁻ pode ser transportados por carregadores específicos através do tonoplasto e armazenado no vacúolo, para posteriormente ser metabolizado no citosol da mesma célula ou ser translocado para outros drenos da planta (BREDEMEIER, C. & MUNDSTOCK, 2000).

O NO₃⁻ combina um efeito osmótico sobre a absorção da água com um subsequente efeito nutricional sobre a síntese de proteínas (McINTYRE, 1997). Segundo MILLER and

SMITH (2008) o nitrato nos vacúolos não é somente importante para o estoque, mas também para a manutenção de turgor nas células, o citossol é um ambiente iônico cuidadosamente regulado com homeostase não somente de pH, fosfato e cálcio, mas também de concentração de nitrato.

A capacidade de rápido acúmulo de NO_3^- na fase inicial de crescimento pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo de vida, principalmente quando do enchimento dos grãos (HIREL et al., 2001; SOUZA et al., 1998; 1999).

RODRIGUES et al. (2004) atribuíram a elevada eficiência do uso de N da variedade local de arroz Piauí quando comparada a IAC-47 a sua grande capacidade para armazenar o N absorvido no estágio inicial de crescimento e remobilizá-lo no final do ciclo para a síntese de proteínas nos grãos. Isso devido à remobilização de N em plantas ser um processo metabólico complexo e de muita importância para a produtividade porque recicla uma grande quantidade do N armazenado em compostos orgânicos para os órgãos em desenvolvimento, principalmente os grãos (MASCLAUX et al., 2001).

A alta eficiência de remobilização de Nitrogênio (ERN) durante o enchimento de grãos é desejável visto que afeta o crescimento e a qualidade dos grãos em termos de conteúdo de proteínas (PEETERS & LAERE, 1994). A remobilização de nitrogênio de órgãos fonte parece estar sempre ligada ao incremento na atividade de proteases e senescência da folha (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008). Segundo KANT et al. (2011) a maioria da remobilização ocorre durante a senescência, quando o N é transportado principalmente via aminoácidos.

O metabolismo de nitrogênio durante a senescência envolve muitas enzimas, por exemplo, a glutamina sintetase citosólica (GS1), codificada por uma família multigênica; glutamato desidrogenase (GDH); asparagina sintetase (AS) e transaminases (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008). FELLER et al. (1994) observaram um aumento na atividade da GS e GDH durante a senescência foliar.

A glutamina sintetase (GS) é uma enzima de grande importância para a EUN pelas plantas, principalmente por seu envolvimento na remobilização e reciclagem de nitrogênio, apresentando aumento de atividade no estágio reprodutivo do ciclo de desenvolvimento. Estudos têm demonstrado que isoformas de GS citosólica são envolvidas na remobilização de nitrogênio durante a senescência, e enfatizado um papel na produção de sementes em espécies de cultivo com grãos pequenos. (SWARBRECK et al., 2011)

A GS é uma enzima de grande importância para a EUN pelas plantas, principalmente por seu envolvimento na remobilização e reciclagem de nitrogênio, apresentando aumento de atividade no estágio reprodutivo do ciclo de desenvolvimento. Estudos têm demonstrado que isoformas de GS citosólica são envolvidas na remobilização de nitrogênio durante a senescência, e enfatizado um papel na produção de sementes em espécies de cultivo com grãos pequenos. (SWARBRECK et al., 2011)

Em plantas, a glutamina sintetase (EC 6.3.1.2) catalisa a ligação ATP-dependente de íons amônio ao glutamato para produzir glutamina (TABUCHI et al., 2007). São identificados três membros da GS em arroz (OsGS1.1, OsGS1.2, e OsGS1.3;) (ISHIYAMA et al. 2004; TABUCHI et al. 2005, 2007).

Entre os três genes GS1 em arroz, o GS1.1 é expresso em todos os órgãos (raiz, folha bandeira, bainha foliar e espiguetas), com alta expressão na folha bandeira durante o estágio reprodutivo (TABUCHI et al. 2005). Produtos do gene OsGS1.1, que é localizado em células companheiras e células do parênquimas dos tecidos das plantas, são responsáveis pela geração de glutamina para a remobilização via floema (MASCLAUX-DAUBRESSE et al., 2008). Fortes evidências tem estabelecido ligação dos genes GS1 com o enchimento dos grãos em arroz e milho pelo uso de mutantes que tem como gene alvo GS citosólica (TABUCHI et

al.,2005; MARTIN et al., 2006). CAI et al (2009) sugerem que o aumento da eficiência de uso de N pode ser alcançado através da manipulação de isoenzimas de GS específicas em plantas transgênicas desenvolvidas para cultivos

Segundo TABUCHI et al. (2007) a GS1.1 é importante para o crescimento e enchimento normal dos grãos, e GS1.2 e a GS1.3 não são capazes de compensar a função da GS1;1. Recentes estudos sugem que as isoformas GS1.3 e GS1;4 desempenham um importante papel na economia de N da planta, não somente em tecidos vegetativos como também em órgãos reprodutivos durante seu desenvolvimento (CAÑAS et al., 2009)

Já a GS2 (GS plastidial) desempenha um papel crucial na assimilação do NH_4^+ durante a fase de crescimento vegetativo e do NH_4^+ liberado via fotorrespiração (WALLSGROVE et al. 1987). GS2 também pode ser importante para a assimilação de amônio a partir da redução de nitrato em leguminosas (WOODALL and FORDE, 1996; ZOZAYA-HINCHLIFFE et al.,2005).

A glutamato sintase (GOGAT) catalisa a transferência redutora de grupos amida da glutamina para o 2-oxoglutarato (2-OG) para formar duas moléculas de glutamato (IRELAND and LEA 1999). Existem varias vias metabólicas relacionadas com o 2-OG, que incluem (i) mitocondrial: NAD-dependente isocitrato desidrogenase (IDH), (ii) mitocondrial: glutamato desidrogenase (GDH), (iii) NADP-dependente isocitrato desidrogenase e (iv) aminotrasferases usando glutamato como amino-doador (HODGES, 2002).

Durante a remobilização de N em cereais, a GS1 facilita a síntese de glutamina que é a mais abundante forma de N reduzido encontrada no floema, e o NADH-GOGAT é importante no desenvolvimento de órgãos drenos para a remobilização de glutamina em arroz (ANDREWS et al., 2004).

Pesquisas sobre a captação e distribuição de N orgânico foram focadas nos aminoácidos (incluindo amidas), que representam na maioria das plantas a principal forma de transporte para o N orgânico no floema e xilema (RENTSH et al., 2007). Desta maneira, nas varias partes da planta, transportadores para aminoácidos são requeridos, por exemplo, para carregamento para o floema em folhas, carregamento para o xilema em raízes, transferência de aminoácidos entre os dois sistemas vasculares e para o descarregamento em sementes em desenvolvimento (OKUMOTO et al., 2002).

Até agora, transportadores de aminoácidos tem sido identificados como membros de pelo menos cinco famílias de genes e estas proteínas de transporte mostram diferentes seletividades e afinidades com substratos assim como diferentes localização subcelular (RENTSH et al., 2007). Esta abundância de transportadores de aminoácidos sugere múltiplos papeis, fundamentais no crescimento e desenvolvimento da planta (LIU & BUSH, 2006)

Embora muito da pesquisa inicial sobre os aspectos moleculares do transporte de N orgânico tenha sido realizada usando *Arabidopsis thaliana*, alguns transportadores homólogos tem sido identificados e analisados em outros modelos ou plantas cultivadas, incluindo tomate, fava, mamona, ervilha, cevada e arroz (LIU & BUSH, 2006; TEGEDER & WEBER, 2006; WATERWORTH & BRAY, 2006; LUBKOWITZ, 2006).

Transporte de alta afinidade para todos os aminoácidos disponíveis é um pré-requisito essencial para o desenvolvimento da semente visto que o acúmulo de proteínas de reserva é precedido pela importação de aminoácidos (OKUMOTO et al., 2002).

Segundo HIRNER et al. (1998) a expressão de transportadores de aminoácidos em sementes precedeu a expressão de proteínas de reserva em *Arabidopsis*. Os transportadores LHT1, AAP1 e AAP5 além da função de captar aminoácidos na raiz, são envolvidos na redistribuição de aminoácidos em células do mesófilo (LHT1; CHEN & BUSH, 1997; HIRNER et al., 2006), transporte de aminoácidos para o desenvolvimento e acúmulo de proteínas reserva (AAP1; FROMMER et al., 1993; KWART et al., 1993; FISCHER et al.,

1995; HIRNER et al., 1998) e carregamento de aminoácidos no floema em folhas maduras (AAP5: FISCHER et al., 1995).

Entre os diferentes genes de transportadores de aminoácidos identificados em *Arabidopsis* até agora, AAP1 e AAP2 foram os mais expressos em silículas imaturas, indicando um papel no abastecimento com nitrogênio orgânico das sementes em desenvolvimento, além disso, a sincronização da expressão de AAP8 também indica um papel na suplementação de sementes com N orgânico (OKUMOTO et al., 2002).

SPEROTTO et al. (2009) trabalhando com arroz identificaram o OsNAC5 como novo fator de transcrição dependente de ABA que é associado a senescência e pode estar relacionado com a remobilização de Fe, Zn e aminoácidos de tecidos verdes para sementes. A ação desse gene então pode ser importante, contribuindo para o aumento dos teores desses elementos e de proteínas em grãos.

A síntese de proteínas de reserva é dependente da disponibilidade de nitrogênio na semente. Desta maneira, o acúmulo de proteína pode ser controlado pela capacidade da própria semente importar aminoácidos via transportadores específicos (ROLLESTECHECK et al., 2005). Então a identificação e caracterização do sistema de transporte que direciona o fluxo de metabólitos nitrogenados entre compartimentos celulares, em tecidos e órgãos, e ao longo da planta são cruciais para o entendimento do transporte e distribuição desse elemento (RENTSH et al., 2007).

O entendimento da variabilidade genética para a atividade de enzimas relacionadas com o metabolismo de nitrogênio em plantas, bem como sua correlação com o uso eficiente de nitrogênio é de grande importância para o desenvolvimento de variedades adaptadas a ambientes agrícolas com baixa disponibilidade de nutrientes.

A avaliação da capacidade de absorção e remobilização do nitrogênio em cada estágio do desenvolvimento da planta fornece dados importantes para a avaliação de sua eficiência na utilização desse nutriente e pode ser utilizada no planejamento de uma agricultura ecológica e economicamente sustentável.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Condução do Experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 x 4 (variedades x doses de N x coletas) com 4 repetições. Foi utilizado material do horizonte A de solo coletado em área do município de Pinheiral – RJ, classificado como Chernossolo. O material da camada de 0-20 cm foi peneirado, em peneira de 2 mm, para obtenção de TFSA (terra fina seca ao ar) e 8 kg de TFSA foram colocados em vasos plásticos com capacidade de 10 litros. A umidade do solo foi mantida entre 80 a 90% da capacidade de campo.

Foram plantadas 10 sementes por vaso da variedade de arroz melhorada IAC 47 e de três variedades locais do estado do Maranhão: Píauí, Bico Ganga e Revenda. Posteriormente foi feito o desbaste de maneira a permanecerem apenas duas plantas por vaso na época do perfilhamento.

Os tratamentos foram constituídos de doses equivalentes a 60 kg/ha e 100 kg/ha de N. No tratamento 1 as plantas receberam adubação nitrogenada referente a uma dose de 60 kg/ha de N (foram aplicados 40 kg/ha de N na ocasião do plantio e 20 kg/ha de N 10 dias após o plantio), e as plantas submetidas ao tratamento 2 receberam 60 kg/ha de N no período de implantação do experimento (foram aplicados 40 kg/ha de N na ocasião do plantio e 20 kg/ha de N 10 dias após o plantio) e 40 kg/ha de N no período da antese, totalizando 100kg/ha de N (Figura 1). A fonte nitrogenada utilizada para compor os tratamentos foi a uréia e a adubação realizada no período da antese foi via aplicação de solução no solo.

As doses de outros nutrientes para o desenvolvimento das plantas, como P e K, assim como as doses de N necessárias para compor os tratamentos foram determinadas de acordo com análise de solo, seguindo as recomendações para atender as necessidades da cultura.

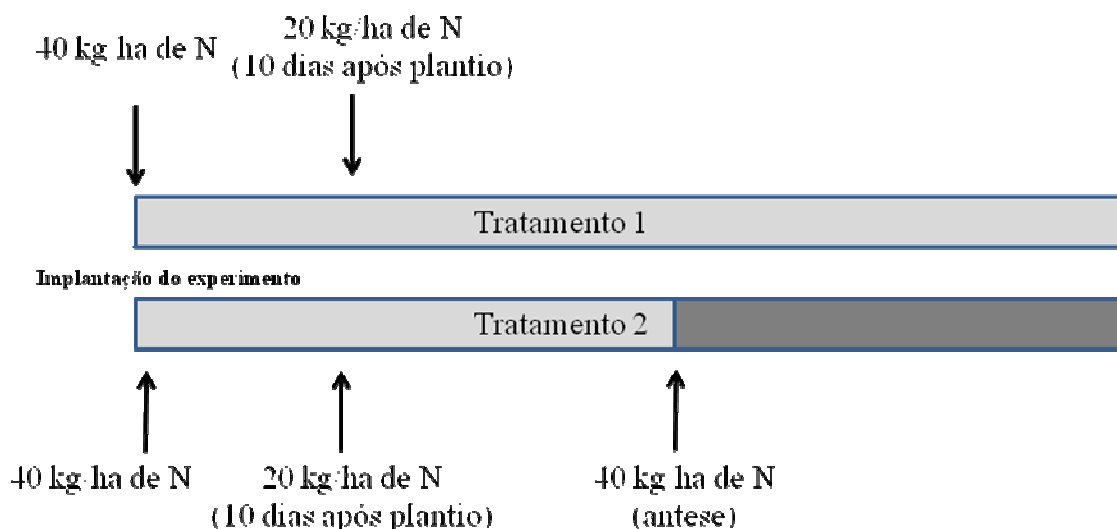


Figura 1. Esquema do cultivo das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no início do experimento) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

Foram realizadas quatro coletas durante toda a fase de desenvolvimento reprodutivo das plantas. A primeira no "emborrachamento" (ou seja, aos 15 dias antes da antese, DAA), a

segunda na antese, a terceira aos 15 dias depois da antese (DDA) e a última ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas (Fig. 2). Foi considerada a época de antese quando mais de 50% das plantas haviam emitido panículas.

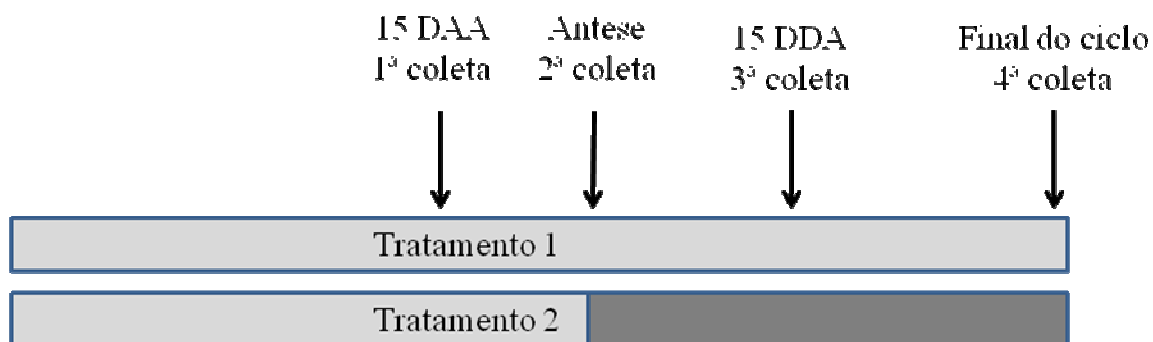


Figura 2. Coletas das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha^{-1} no início do experimento) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com $40 \text{ kg de N ha}^{-1}$ na antese.

DAA: dias antes da antese, DDA: dias após a antese.

Segundo SABINO (2007) o acúmulo de substâncias de reserva atinge maior valor na antese e a partir dessa fase os carboidratos são em grande parte deslocados para as espiguetas. SOUZA (1995) em trabalho com aplicação suplementar de nitrogênio em variedades de arroz aos 10 e 20 dias após a antese verificou que, não apenas a época de aplicação como também a dose aplicada de N afeta os teores de proteína bruta e o acúmulo diferencial das frações protéicas nos grãos.

Deste modo, as datas das coletas foram distribuídas no presente experimento para uma melhor caracterização das variedades quanto às diferenças de eficiência de remobilização. Essa distribuição de datas das coletas permite uma melhor cobertura do período reprodutivo para a avaliação da expressão de genes e atividade das enzimas relacionadas com a remobilização de N.

3.2 Análise da Produção de Massa Seca e N-total

O material vegetal coletado foi pesado e colocado para secar a 65°C em estufa de ventilação forçada por 72h para obtenção da massa seca das diferentes partes da planta: folha bandeira, folha 2, folhas verdes, folhas amarelas, bainha, panícula e raízes. A massa seca total foi obtida a partir da soma das partes.

Após secagem o material foi triturado e pesado para avaliação de N-total segundo TEDESCO et al. (1998). Não foi determinado o teor de N-total das raízes devido à dificuldade de limpeza do material para evitar contaminação com a terra utilizada nos vasos.

3.3 Análise das Frações Solúveis

Na primeira, segunda e terceira coletas as amostras de 1 grama do terço médio das folhas foram retiradas e acondicionadas em geladeira em frascos contendo 20 ml de etanol 80%. Posteriormente essas amostras foram homogeneizadas e trituradas utilizando um triturador de tecidos, filtradas em quatro camadas e gaze e papel filtro e transferidas para funil de separação, onde foi adicionado volume de clorofórmio igual ao da solução alcoólica para a separação das fases apolar e polar. A fase polar (fração solúvel) foi elevada a 25 ml e utilizada para as análises de N-amino livre (YEMM & COCKING, 1955), N-NH_4^+ (FELKER, 1977), N-NO_3^- (CATALDO et al., 1975), açúcares solúveis (YEMM & WILLIS, 1957).

3.4 Avaliação da Expressão Gênica

Foram avaliadas as expressões dos genes que codificam para as isoformas de Glutamina Sintetase: GS1.1, GS2 e GS1.3 nas folhas bandeira, folhas 2 e panículas das variedades de arroz IAC-47 e Piauí. Essas duas variedades foram escolhidas por terem apresentado resultados de análise de metabólitos mais contrastantes. Para a análise da expressão gênica foram utilizadas amostras das coletas realizadas aos 15 DAA, na antese e aos 15 DDA.

3.4.1 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído segundo GAO et al. (2001) utilizando tampão NTES (0,2 M Tris-Cl pH 8,0; 25 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 2% SDS). As amostras foram maceradas em N₂ líquido e homogeneizadas em uma mistura contendo 1 ml de tampão NTES e 700µL de solução fenol:clorofórmio (1:1). Após centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. O RNA total foi precipitado pela adição de 1/10 volume de 2 M acetato de sódio pH 4,8 (NaOAc_{DEPC}) e 1 volume de isopropanol puro gelado. A seguir a mistura foi mantida a -80 °C por 1 hora seguida de centrifugação a 12.000 x g por 20 min. O precipitado foi solubilizado em 0,5 mL de H₂O_{DEPC} e precipitado novamente pela adição de 0,5 mL de 4 M cloreto de lítio pH 4,8 (LiCl_{DEPC}). Após centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos, o precipitado foi lavado com etanol 70% e dissolvido em 30µL de H₂O_{DEPC}. A qualidade do RNA extraído foi verificada espectrofotometricamente por meio das relações A₂₆₀/A₂₃₀ e A₂₆₀/A₂₈₀ e visualização em gel de agarose (1%) com brometo de etídio.

3.4.2 Síntese de cDNA e PCR em tempo real

Amostras de 1µg de RNA foram tratadas com DNase I (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. A fita simples de cDNA foi sintetizada utilizando a “TaqMan Reverse Transcription Reagents” (Applied Biosystems) e “*primer*” oligodT de acordo com as recomendações do fabricante.

Os “*primers*” foram desenhados com o auxílio do programa Primer Express 3.0 (Tabela 1). A especificidade de cada “*primer*” foi analisada por alinhamento das seqüências no banco de dados (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e experimentalmente no fim da reação de PCR durante a curva de “*melting*”. Todos os “*primers*” foram específicos para os genes analisados.

Tabela 1. Iniciadores (*primers*) *forward* e *reverse* para análises por PCR em tempo real dos genes das isoformas de glutamina sintetase citossólica (*OsGS1.1* e *1.3*) e plastidial (*OSGS2*) de arroz e gene controle da actina (*OsActin*).

Gene	Proteína	“ <i>Forward primer</i> ”	“ <i>Reverse primer</i> ”
<i>OsGS11</i>	GS1.1	5'CCACGACATCCTCGTCATC3'	5'CCAGCACAAATGCAATTCAC3'
<i>OsGS2</i>	GS2	5'GGCAAATAAATCCCAGCAA3'	5'TTAAGTGGCGAATGGAAGGT3'
<i>OsGS13</i>	GS1.3	5'AGCCGATTCCGACGAACAAC3'	5'GTAGCGTGCCACCCAGACAT3'
<i>OsActin11</i>	Actina	5'CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGA3'	5'CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA3'

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata, utilizando o kit “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi realizada da seguinte maneira: dez minutos a 95°C, quarenta ciclos de amplificação com 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto e finalmente a “curva de dissociação (*melting*)” com aumento de temperatura de 0,3°C de 60°C até 95°C para verificar a

especificidade da reação. O gene da actina foi utilizado como controle endógeno para o cálculo da expressão gênica relativa (JAIN et al., 2006).

3.5 Atividades Enzimáticas

3.5.1 Atividade de glutamina sintetase

A atividade de Glutamina Sintetase (GS) foi feita como descrito por FARDEN & ROBERTSEN (1980). A atividade foi avaliada em 500µL de uma solução contendo 50mM de Imidazol-HCl pH 7,5, 5mM de hidroxilamina neutralizada com Tris, 20mM de MgCl₂, 25mM de L-glutamato, 5mM de β-mercaptoetanol e 5mM de ATP. O controle da reação foi realizado sem a adição de ATP no meio de reação. A reação foi paralisada pela adição de 350µL de uma solução composta por 4% (p/v) de ácido tricloroacético – TCA e 3,2% (p/v) de cloreto férrico anidro – FeCl₃ preparada em HCl 0,5N. O γ-glutamil hidroxamato (GHD) foi colorimetricamente determinado em λ=540 nm. Foram utilizados dados de quantificação de proteínas presentes no extrato para fazer os devidos cálculos de atividade de enzima/quantidade de proteína pipetada.

3.5.2 Atividade de nitrato redutase

Esta análise foi realizada por ocasião das coletas, utilizando a metodologia descrita por JAWORSKI (1971). O método é baseado no princípio de que a concentração de nitrito (NO₂⁻) liberada por fragmentos de tecidos foliares de peso conhecido em uma solução tampão, na presença de propanol e do substrato (NO₃⁻), reflete a atividade potencial da NR *in situ*. A atividade da enzima foi estimada pela quantidade de NO₂⁻ liberada em uma solução de incubação, quantificado por reação colorimétrica em espectrofotômetro, a 540 nm, e expressa em µmoles de NO₂⁻ g⁻¹ MF h⁻¹.

Como a atividade da enzima é afetada pela luz todas as coletas em que esse parâmetro foi medido tiveram início por volta das 9 horas de manhã. As plantas expostas a luz solar foram levadas até o laboratório e foram separadas em folha bandeira, folha 2, folhas verdes, folhas amarelas, bainha e panícula.

Amostras de 0,2 gramas de tecido vegetal fresco de cada parte da planta foram retiradas e colocadas em tubos de ensaio contendo 5 ml de uma solução tampão fosfato (0,1 M de KH₂PO₄ pH 7,5, 3% N-propanol e NO₃ 0,02M) posteriormente as amostras foram colocadas em banho-maria a 30°C por 1 hora em condições de ausência de luz.

Para a reação foram retiradas alíquotas de 0,4 ml da solução incubadora e adicionou-se posteriormente 0,3 ml de sulfanilamida 1% em HCl 3 M e 0,3 ml de n-naftil-etileno-diamino (0,02%). Após 20 minutos 4 ml de água foram adicionados as amostras e efetuou-se a leitura em espectrofotômetro a 540 nm contra um padrão de NaNO₂.

Em algumas coletas os valores não foram determinados devido à falta de material vegetal na parte da planta analisada. Isso ocorreu principalmente nas coletas 2 e 3, que foram realizadas na ocasião da antese e aos 15 dias após a antese, quando a planta já estava remobilizando metabólitos para a panícula e por isso já não foram encontradas folhas verdes na maioria das repetições. Nas coletas 1 e 3 a atividade não foi medida nas panículas já que estas ainda não tinham sido emitidas na primeira coleta e já estavam secas na última.

3.6 Parâmetros Associados à Eficiência de Uso de Nitrogênio

Foram calculados para as variedades submetidas aos dois tratamentos com e sem suplementação nitrogenada de 40 kg/ha de N, na antese, os seguintes parâmetros:

Índice de Colheita de grãos (ICG): razão entre a produção de grãos (em grama/vaso) e a produção de massa seca total da parte aérea das plantas/vaso

Eficiência de Absorção de N (EAN): razão entre o N total da parte aérea das plantas/vaso (incluindo panículas) e o N fornecido.

Eficiência de Utilização de N (EUtN): razão entre o peso de grãos cheios/vaso e o conteúdo de N na parte aérea

Eficiência de Uso de N (EUN): razão entre o peso de grãos cheios/vaso e o N fornecido.

Absorção de N após a antese: N-total no final do ciclo de desenvolvimento – N-total na antese.

Remobilização de N para os grãos: N-total da parte aérea na antese – N-total da palha na maturidade.

Eficiência de Remobilização de N (ERN): Remobilização de N para os grãos/ N-total na antese.

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa Estatística 7. Os efeitos das variáveis (adubação nitrogenada e variedade) foram verificados pelo teste F (5% de probabilidade). Quando diferenças significativas foram reveladas pela ANOVA, as médias dos tratamentos foram separadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de Massa Seca

Não foram observadas diferenças significativas na massa seca da parte aérea das variedades Piauí e Bico-ganga aos 15 DAA (Figura 3), que apresentaram a maior massa seca nesse período, diferindo significativamente das variedades IAC-47 e Revenda. Na coleta realizada no período da antese são observados menores valores de massa seca na variedade Revenda, que apresentou diferenças significativas com relação às variedades IAC-47, Piauí e Bico-ganga, que não apresentaram diferenças significativas entre si. Houve maior produção de massa seca nas variedades Piauí e Bico-ganga na coleta realizada aos 15 DDA (Figura 3), diferindo significativamente das variedades IAC-47 e Revenda.

Ao final do ciclo de produção das plantas a variedade Piauí continuou apresentando maior massa seca em ambos os tratamentos (Figura 3), diferindo significativamente das variedades IAC-47 e Revenda. A variedade Revenda apresentou menor massa seca ao final do ciclo de desenvolvimento, não diferindo significativamente da variedade IAC-47.

Os resultados observados para as variedades Piauí e Bico-Ganga podem ser atribuídos às características de variedades que não foram melhoradas para a diminuição de porte e redução do seu ciclo, diferentemente das variedades desenvolvidas para a agricultura moderna. Segundo FONSECA et al. (2004) variedades de arroz tradicionais do estado do Maranhão apresentam desvantagens de possuir porte muito alto e ciclo relativamente longo, podendo atingir até 180 dias.

Uma maior massa seca na parte aérea de plantas das variedades Piauí e Bico-Ganga também pode estar associada a sua capacidade de acumular NO_3^- nos tecidos. SCHEIBLE et al. (1997) trabalhando com plantas de fumo observou que o acúmulo de altas concentrações de NO_3^- na parte aérea das plantas foi correlacionado com aumento da relação parte aérea: raiz.

Os menores valores de produção de massa seca aos 15 DDA foram observados nas variedades IAC-47 e Revenda em ambos os tratamentos com adubação nitrogenada, diferindo significativamente das plantas das variedades Piauí e IAC-47.

Quando as plantas foram submetidas à suplementação de 40 kg/ha de N na antese houve maior produção de massa seca na parte aérea das variedades Piauí e IAC-47 ao final do ciclo de desenvolvimento, (Figura 3). Estes resultados são diferentes dos obtidos por SOUZA et al. (1998), que não observou diferenças significativas de massa entre plantas de arroz que receberam suplementação nitrogenada aos 10 e 20 dias após antese e testemunhas sem suplementação no final do ciclo de desenvolvimento. Os autores atribuem esses resultados ao fato do nitrogênio suplementar aplicado ter sido utilizado para outros processos que não o aumento de massa das plantas, observando que a suplementação nitrogenada aumentou o N-total da parte aérea das plantas.

As plantas de Piauí e IAC-47 submetidas à suplementação nitrogenada (ou seja, mais 40 kg/ha de N na antese, além da adubação basal de 60 kg/ha de N) apresentaram maior produção de massa seca na parte aérea na coleta ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas. No entanto ao analisar a produção de massa seca das panículas na mesma coleta (Figura 4) não se observam diferenças significativas na produção de massa seca das panículas de todas as variedades no tratamento com suplementação nitrogenada, quando comparadas as plantas submetidas apenas a adubação basal. A variedade Piauí apresentou menor massa seca de panículas quando submetida ao tratamento apenas com 60 kg/ha de N, diferindo significativamente da variedade Revenda quando submetida ao mesmo tratamento e não diferindo das demais variedades mesmo levando em consideração os dois tratamentos.

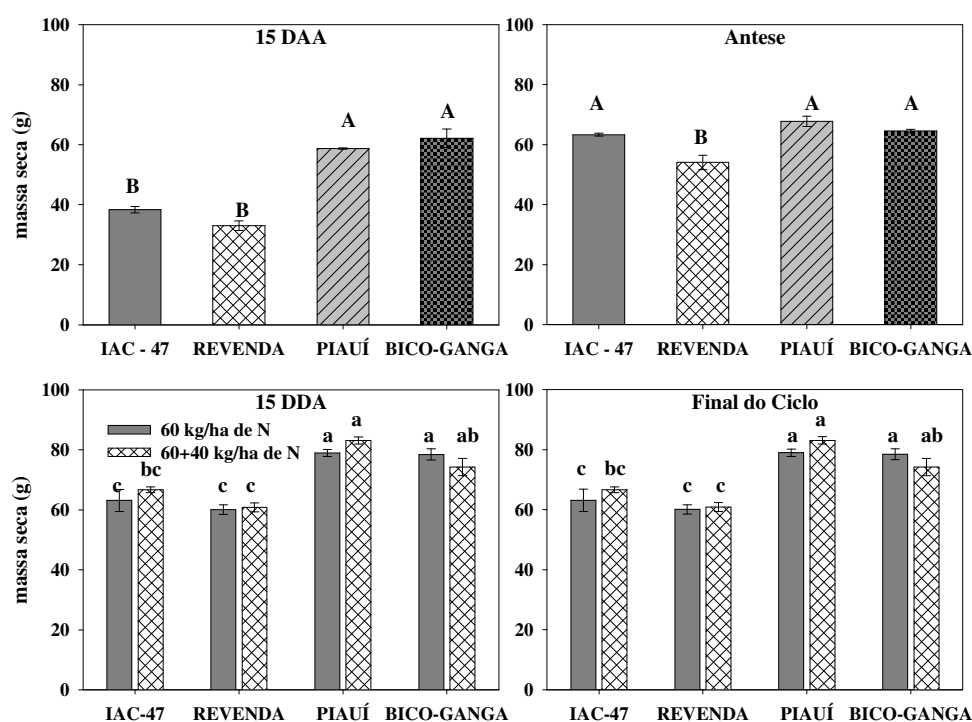


Figura 3. Massa seca da parte aérea das variedades de arroz: IAC47 (tradicional), Revenda, Piauí e Bico Ganga (locais) nas coletas realizadas aos 15 dias antes da antese (15DAA), antese, 15 dias depois da antese (DDA) – tratamento com 60 kg/ha de N, 15 dias depois da antese (DDA) – tratamento com 60+40 kg/ha de N, final do ciclo – tratamento com 60 kg/ha de N e final do ciclo – tratamento com 60 + 40 kg/ha de N. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem com relação à interação variedade x tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se o interessante fato da variedade Revenda ter apresentado menor produção de massa seca da parte aérea no final do ciclo de desenvolvimento das plantas quando submetida apenas ao tratamento com adubação basal no plantio de 60 kg/ha de N (Figura 3) e maior produção de massa seca das panículas (figura 4) sob as mesmas condições. Esses dados podem indicar uma maior capacidade dessa variedade de remobilizar o N absorvido no início do ciclo de desenvolvimento para as panículas, o que pode contribuir de maneira significativa para a produção de grãos e aumento do teor de proteínas.

Estes resultados podem ser relacionados com os obtidos por FERRAZ JÚNIOR et al. (1993), que observaram que a cultivar Revenda apresentou produtividade de grãos próxima a das variedades melhoradas de arroz IAC-1278 e IAC-899 e que a suplementação nitrogenada não afetou a produção de grãos de forma significativa. Essas duas últimas variedades foram lançadas após 1973 o ano de lançamento da IAC-47. A variedade IAC-1278 lançada em 1982 tem como principais características a resistência ao brusone e acamamento, e a IAC-899 lançada em 1978 também tem resistência ao acamamento.

A maior produção de massa seca de raiz foi observada para a variedade Bico-Ganga (Figura 4), diferindo significativamente das demais variedades, o que está de acordo com a menor relação parte aérea raiz (Figura 5) para esta variedade. As demais apresentaram menor produção de massa seca da raiz, não diferindo entre si. Os resultados de menor produção de massa seca das raízes para essas variedades estão de acordo com os maiores valores de relação parte aérea/raiz (Figura 5), diferindo significativamente da variedade Bico-ganga.

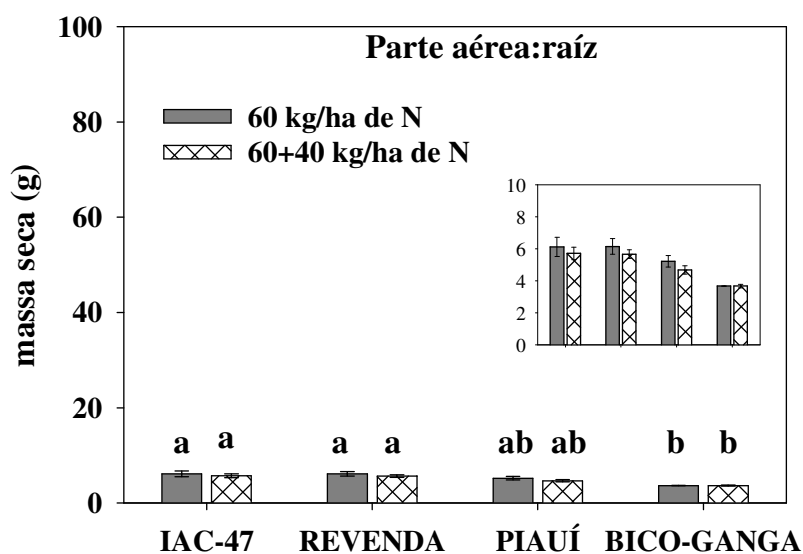


Figura 4. Relação parte aérea: raiz ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (PiauÍ, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas indicam diferenças entre variedades e letras minúsculas nas colunas indicam diferenças entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

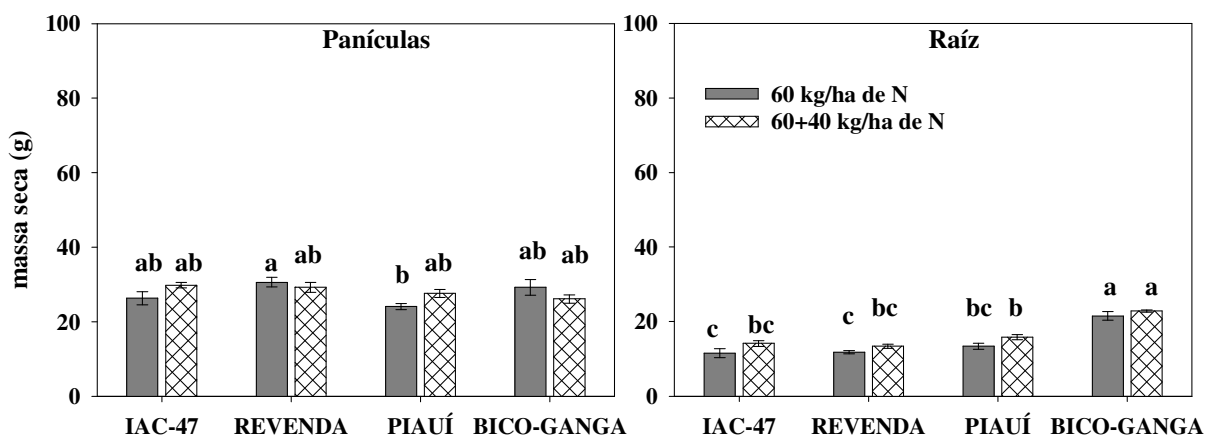


Figura 5. Massa seca das panículas e raízes no final do ciclo de desenvolvimento das plantas de arroz das variedades locais do estado do Maranhão (PiauÍ, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas à adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e com ou sem adubação suplementar de 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O maior investimento da variedade de arroz Bico-ganga na produção de raízes quando comparada às demais variedades e conseqüente menor relação parte aérea/raiz pode indicar uma característica desfavorável à eficiência de uso de N. A razão é que pode resultar em menor capacidade de acúmulo de N na parte aérea da planta no início do ciclo de

desenvolvimento, que é necessária para posterior remobilização do nitrogênio para os grãos. Essa característica pode estar relacionada ao menor teor de proteína nos grãos observados para variedade Bico-Ganga, o que é demonstrado no item 4.3. Apesar das diferenças entre as variedades a suplementação nitrogenada não afetou a massa seca das raízes e a relação parte aérea: raiz dentro das variedades.

4.2 Metabolismo das Plantas de Arroz

A atividade da enzima nitrato redutase (NR) reflete a presença de NO_3^- no citossol no momento da sua determinação. Os baixos valores de atividade de NR observados em todas as variedades e em todas as coletas realizadas podem indicar uma rápida circulação do NO_3^- no citossol, com menor residência do nitrato, ou uma baixa concentração desse nutriente no meio de cultivo, pois as coletas foram realizadas aos 15 dias antes e 15 dias depois da antese, datas já distante das adubações, que foram realizadas no plantio e na antese (Figura 6).

A atividade da NR foi maior em todas as partes das plantas das variedades IAC-47 e Revenda quando comparadas as variedades Piauí e Bico-Ganga na coleta realizada aos 15 DAA (Figura 6). Esses resultados podem estar relacionados a uma maior assimilação do nitrogênio disponível de nitrato por parte das variedades IAC-47 e Revenda em comparação às variedades Piauí e Bico-Ganga. A atividade da NR não foi medida nas panículas na coleta aos 15 DAA, pois as panículas ainda não tinham sido emitidas.

Houve aumento de atividade de NR na variedade Piauí em todas as partes das plantas nas coletas realizadas na antese e aos 15 DDA quando comparadas à atividade da enzima aos 15 DAA (Figura 6), com exceção das folhas verdes e folhas bandeira submetidas ao tratamento com suplementação nitrogenada. Nas bainhas houve aumento de atividade da NR em todas as variedades quando se compara a coleta realizada aos 15 DAA e a realizada aos 15 DDA. Esses aumentos de atividade de NR no período reprodutivo das plantas pode estar associado a remobilização de N para os grãos ou absorção de N pós-antese. Como na primeira coleta o NO_3^- poderia acumular nos vacúolos, a atividade apresentada foi mais baixa. Esse comportamento torna-se mais evidente nas bainhas (Figura 6).

A atividade da NR nas variedades IAC-47 e Revenda diminuiu na coleta realizada na antese nas folhas bandeira e folha 2 em relação a atividade aos 15 DAA e não foi detectada nas folhas verdes, amarelas e panícula. O que pode indicar que o NO_3^- que foi disponibilizado no plantio já havia sido metabolizado pelas variedades IAC-47 e Revenda na época da antese.

A atividade da NR volta a ser detectada na coleta realizada aos 15 DDA nas variedades IAC-47 e Revenda (Figura 6), isto pode ser atribuído ao início da remobilização do N ou absorção pós-antese. Nas folhas bandeira, folhas 2 e folhas amarelas a atividade da NR das plantas que receberam suplementação nitrogenada das variedades IAC-47 e Revenda foi maior que a atividade nas mesmas folhas das plantas que não receberam suplementação nitrogenada, o que pode ser atribuído a utilização do N fornecido. Na bainha esse comportamento não foi observado.

Na coleta realizada aos 15 DDA houve ausência de folhas verdes para a realização das análises devido ao fato das plantas já estarem em estágio avançado de senescência, com exceção das plantas da variedade IAC-47 que receberam suplementação nitrogenada (Figura 6). A suplementação de N no caso da variedade IAC-47 parece ter retardado a senescência, o que poderia justificar a presença de folhas verdes nessas plantas.

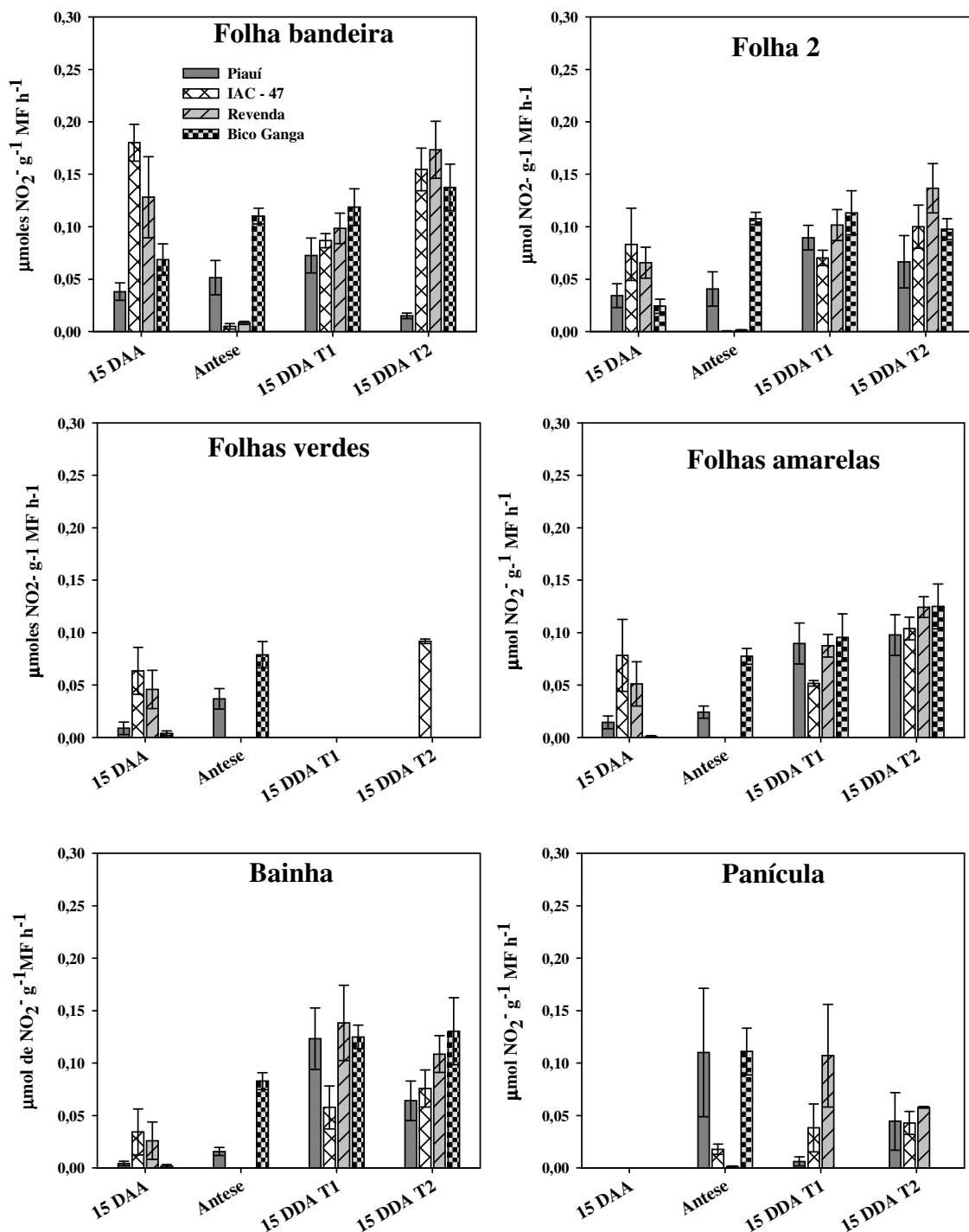


Figura 6. Atividade da nitrato redutase aos 15 dias antes da antese (15DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (DDA) em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) a dois tratamentos: *Tratamento 1*(T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha^{-1} no momento do plantio) e *Tratamento 2* (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com $40 \text{ kg de N ha}^{-1}$ na antese).

As variedades locais de arroz do estado do Maranhão apresentaram maiores teores de NO_3^- que a variedade melhorada IAC-47 na coleta realizada aos 15 DAA, destacando-se a variedade Piauí, que diferiu significativamente das demais nas folhas bandeira, folhas 2, folhas amarelas e colmo (Figura 7). Os maiores valores de NO_3^- corroboram com os menores valores de atividade de NR para essas variedades (Figura 6). GALLAIS e HIREL (2004) sugerem em milho que alta atividade da NR indica genótipos menos eficientes no uso de N.

Nas amostras referentes às coletas na ocasião da antese e aos 15 DDA não houve teores detectáveis de NO_3^- em todas as partes das plantas o que pode ser justificado pela maior atividade da NR nessas coletas (Figura 7). A não detecção de nitrato na variedade IAC-47 aos 15 DAA pode refletir uma menor capacidade dessa variedade em armazenar N na forma de nitrato em seus vacúolos ou em uma maior velocidade de assimilação desse nutriente pela IAC-47. O fato da variedade Piauí apresentar maiores teores de nitrato na coleta realizada aos 15 DAA (figura 7) demonstra que o nitrato absorvido pela Piauí não é reduzido de imediato, podendo ser armazenado. É provável que os altos teores de NO_3^- observados na variedade Piauí tenham sido armazenados no período em que o nutriente estava disponível, enquanto a variedade IAC-47 tenha metabolizado prontamente o N assim que se tornou disponível. Isto pode estar associado ao fato da variedade IAC-47 ter sido melhorada para uma agricultura de altos aportes de nutrientes.

Segundo RODRIGUES et al. (2004) aparentemente a capacidade da variedade Piauí de absorver e acumular NO_3^- e sua menor atividade da NR nas fases iniciais de crescimento e até a antese podem ser os mecanismos que permitem a esta variedade um elevado acúmulo de N nos grãos. As variedades de arroz Revenda e Bico-ganga também apresentaram acúmulo de N- NO_3^- nos tecidos aos 15 DAA. (Figura 7), sendo menores os valores observados quando comparados aos da variedade Piauí. ARAÚJO (2010) verificou que a variedade Revenda demonstra ter mecanismos que propiciam maior capacidade de absorção de nitrato quando ele se torna disponível à planta. Apenas a variedade IAC-47 não apresentou acúmulo de N- NO_3^- nos tecidos (Figura 7).

Estes resultados podem estar relacionados ao acúmulo de N na forma de NO_3^- no período vegetativo, principalmente quando os maiores teores são observados na bainha. SANTOS et al. (2009) demonstraram que plantas de arroz acumulam N- NO_3^- preferencialmente nas bainhas. A capacidade de rápido acúmulo de NO_3^- na fase inicial de crescimento pode propiciar um maior estoque de N disponível para o metabolismo das plantas nas fases posteriores de seu ciclo de vida, principalmente quando do enchimento dos grãos (HIREL et al., 2001; SOUZA et al., 1998, 1999).

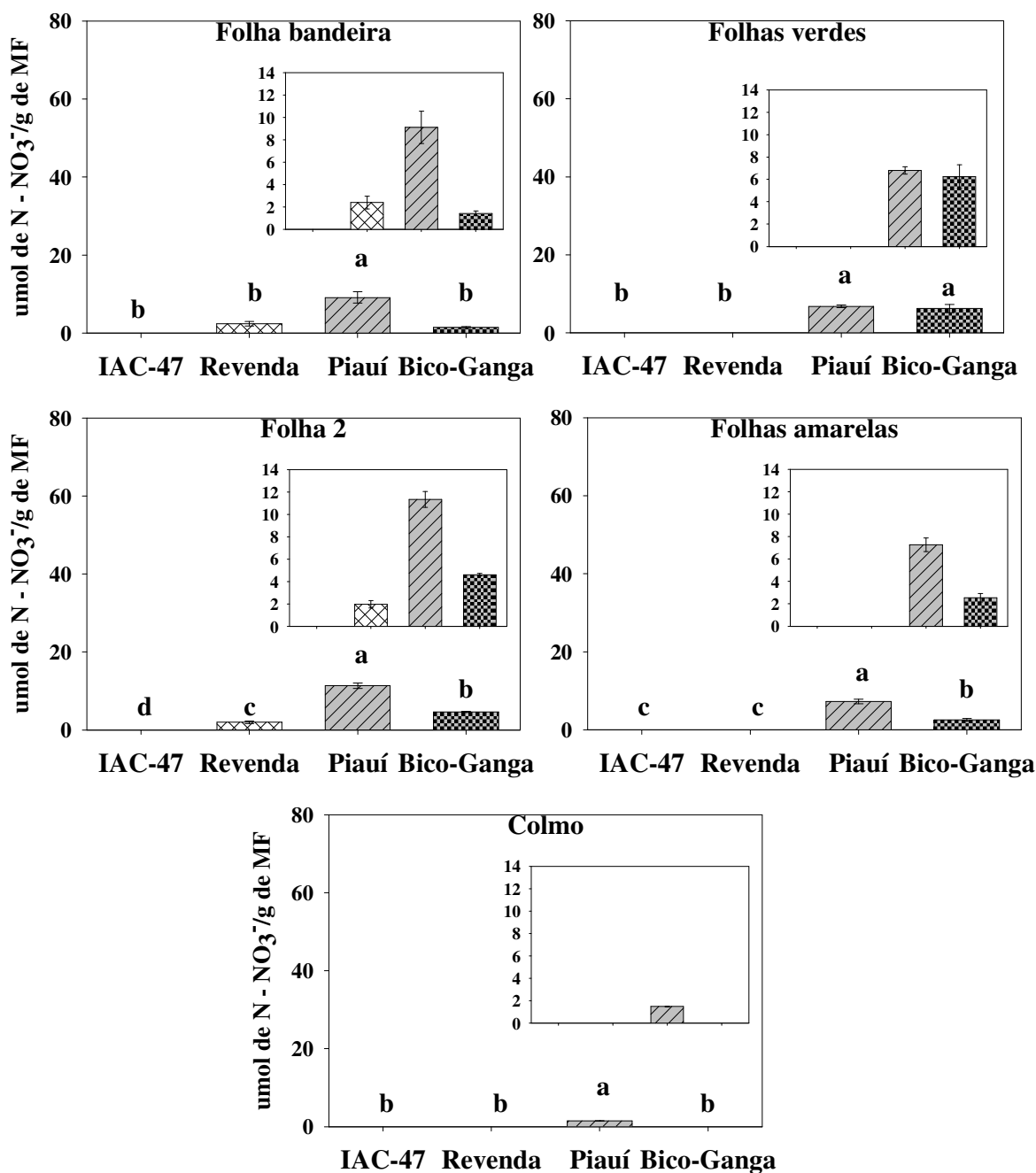


Figura 7. Teores de Nitrato aos 15 dias após a antese (DAA) observado em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal na época do plantio com 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O conteúdo de NO₃⁻ calculado através da multiplicação do teor do elemento pela produção de massa seca produzida, seguiu o mesmo comportamento dos teores (Figuras 7 e 8), evidenciando acúmulo de NO₃⁻ nos tecidos das plantas das variedades locais de arroz do estado do Maranhão. Como não foram detectados nas coletas realizadas no período da antese e aos 15 DDA os teores de nitrato são zero (Figura 8).

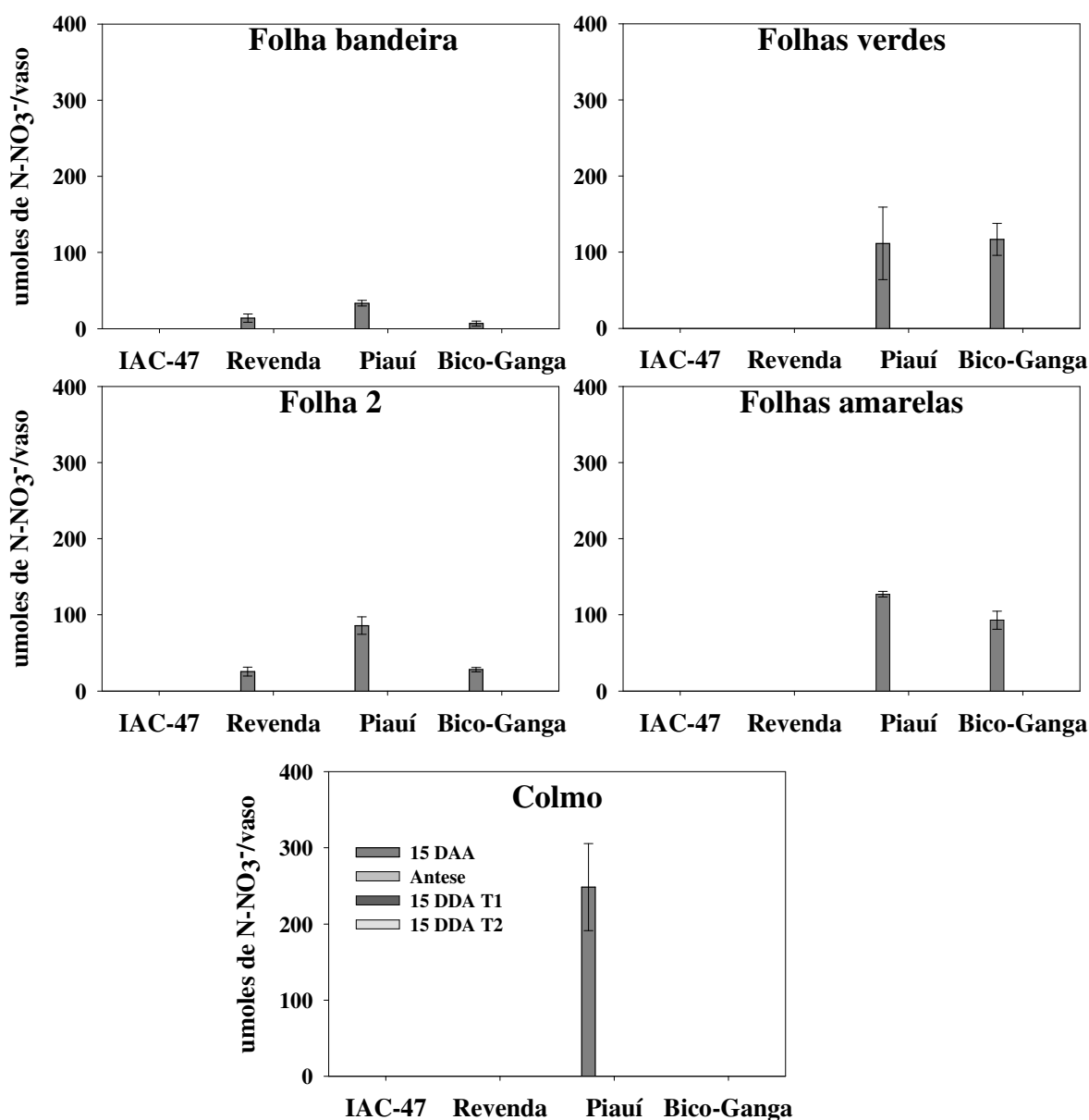


Figura 8. Conteúdo de Nitrato (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

Para demonstrar o acúmulo de N- NO₃ em cultivos de arroz nas variedades locais do estado do Maranhão foram calculados os acúmulos desse nutriente na forma de N-nítrico em g/ha, levando-se em consideração uma densidade de plantio de 100000 plantas/ha. Os maiores valores foram observados para a variedade Piauí, que acumulou cerca de 140 g/ha de N nos colmos (Figura 9).

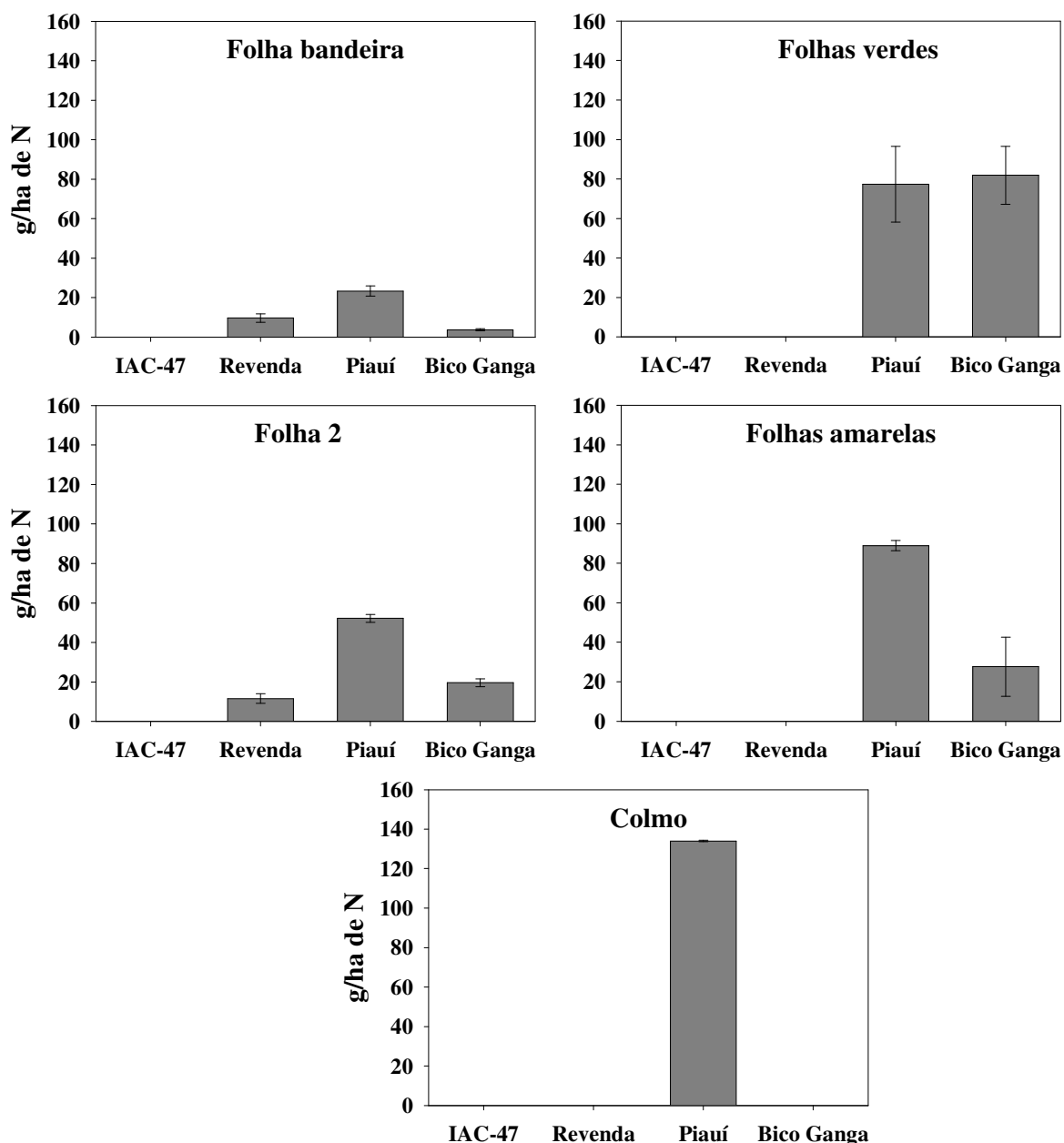


Figura 9. Acúmulo de nitrato em g/ha aos 15 dias antes da antese (DAA) observado em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N. no plantio

Esses resultados demonstram acúmulo de N na forma de nitrato na variedade Piauí no período vegetativo do seu ciclo de desenvolvimento. Apesar dessa característica ser de grande interesse em programas de melhoramento e para a identificação de mecanismos associados à EUN os resultados demonstram uma contribuição pouco significativa do N acumulado em forma de nitrato para a remobilização de nitrogênio para os grãos.

Os baixos teores de N-amino observados em todas as variedades de arroz (Figuras 10, 11 e 12) podem estar relacionados aos possíveis baixos teores disponíveis de N-NO_3^- no solo na época em que foram retiradas as amostras, uma vez que as coletas foram realizadas já em períodos distantes da adubação basal e da suplementação. Segundo SCHNEIBLE et al. (1997) o conteúdo de aminoácidos nas folhas geralmente correlaciona-se com o fornecimento de N.

Não foram observadas diferenças significativas para os valores de N-amino entre as variedades de arroz nas folhas bandeira e folhas verdes na coleta realizada aos 15 DAA (Figura 10). A variedade IAC-47 apresentou maiores valores de N-amino nas folhas 2, não diferindo significativamente da variedade Piauí aos 15 DAA (Figura 10). Maiores teores de N-amino foram observados nas variedades Piauí, Bico-ganga e IAC-47 nas folhas 2, folhas amarelas e colmo, não diferindo significativamente entre si.

Observou-se um comportamento interessante da variedade de arroz Revenda com o passar do ciclo de desenvolvimento das plantas. Essa variedade, que apresentou menores valores de N-amino na coleta realizada aos 15 DAA nas folhas 2, folhas amarelas e colmos (Figura 10) passou a apresentar valores mais elevados nesses mesmos tecidos na coleta realizada no período da antese (Figura 11), não mais apresentando valores significativamente menores em relação aos das demais variedades. Fato contrário é observado para a variedade Piauí, que volta a apresentar maiores valores de N-amino na coleta ocorrida aos 15 DDA.

Valores observados para a variedade Revenda na coleta aos 15 DDA (Figura 12) demonstram maior acúmulo de N-amino em todas as partes das plantas dessa variedade, com exceção da panícula, no tratamento com suplementação de 40 Kg/ha de N, sendo significativamente diferente nas folhas bandeira, folhas 2 e folhas amarelas. Demonstrando maior resposta que as demais variedades à suplementação nitrogenada (Figura 12).

Os maiores teores de N-amino livre ocorreram nas plantas que não receberam suplementação nitrogenada das variedades Piauí e Bico-Ganga na coleta ocorrida aos 15 DDA (Figura 12). Ao se comparar as coletas realizadas aos 15 DAA (Figura 10) e aos 15 DDA (Figura 12) pode ser observado que apesar dos valores apresentados serem baixos, há um interessante comportamento das variedades locais de arroz do estado do Maranhão, em relação aos teores de N-amino ao longo das diferentes coletas. Como pode ser verificado nas figuras 10,11 e 12 há um aumento dos teores de N-amino em todas as partes das plantas das variedades locais de arroz quando comparada as coletas realizadas aos 15 DAA e antese. A variedade IAC-47 apresenta comportamento contrário, com menores teores de N-amino na coleta realizada aos 15 DDA quando comparada com as primeiras coletas. As plantas da variedade Revenda submetidas ao tratamento sem suplementação nitrogenada apresentaram comportamento semelhante ao da IAC-47.

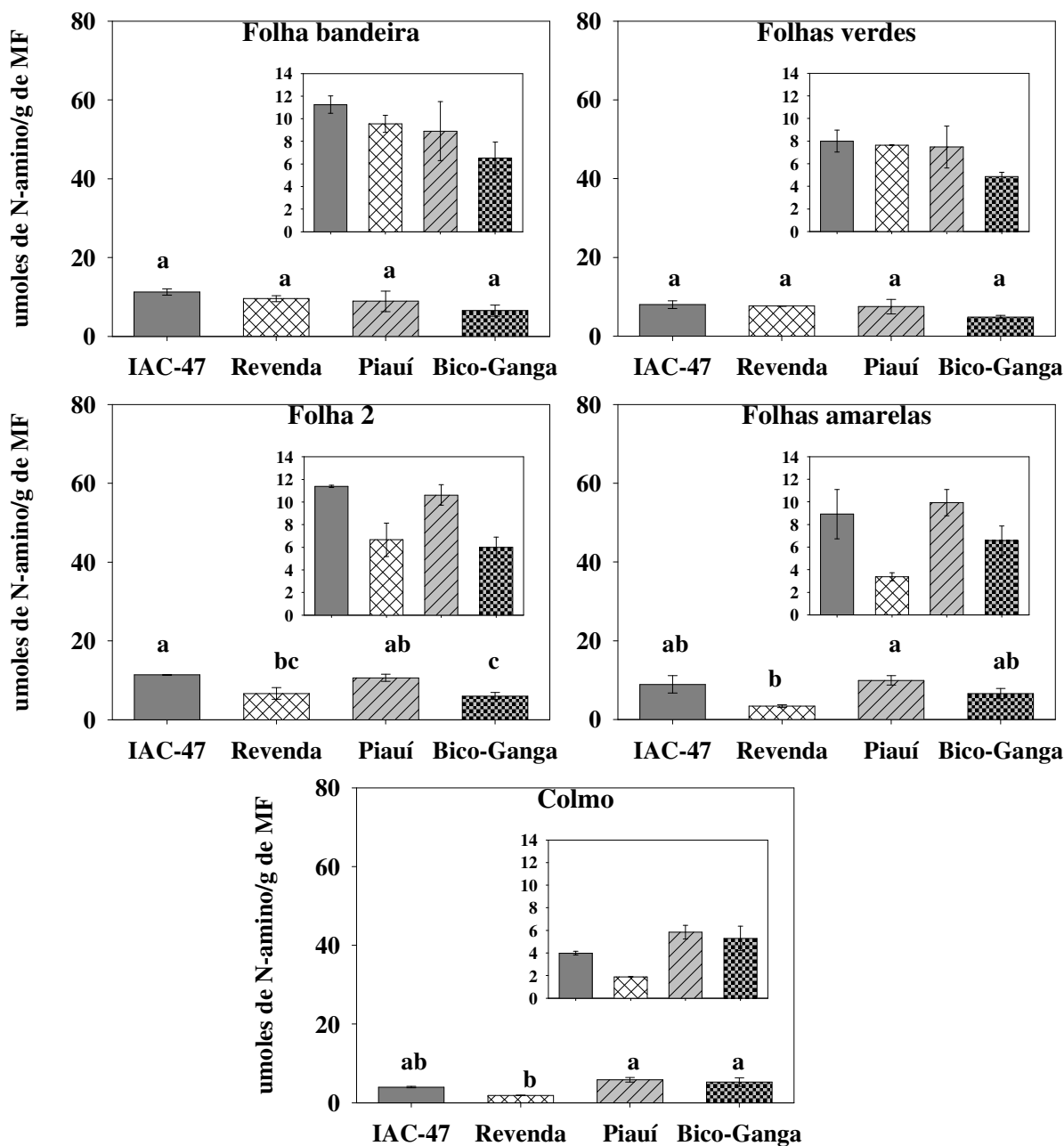


Figura 10. Teores de N-amino livre observados aos 15 dias antes a antese (DAA) em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

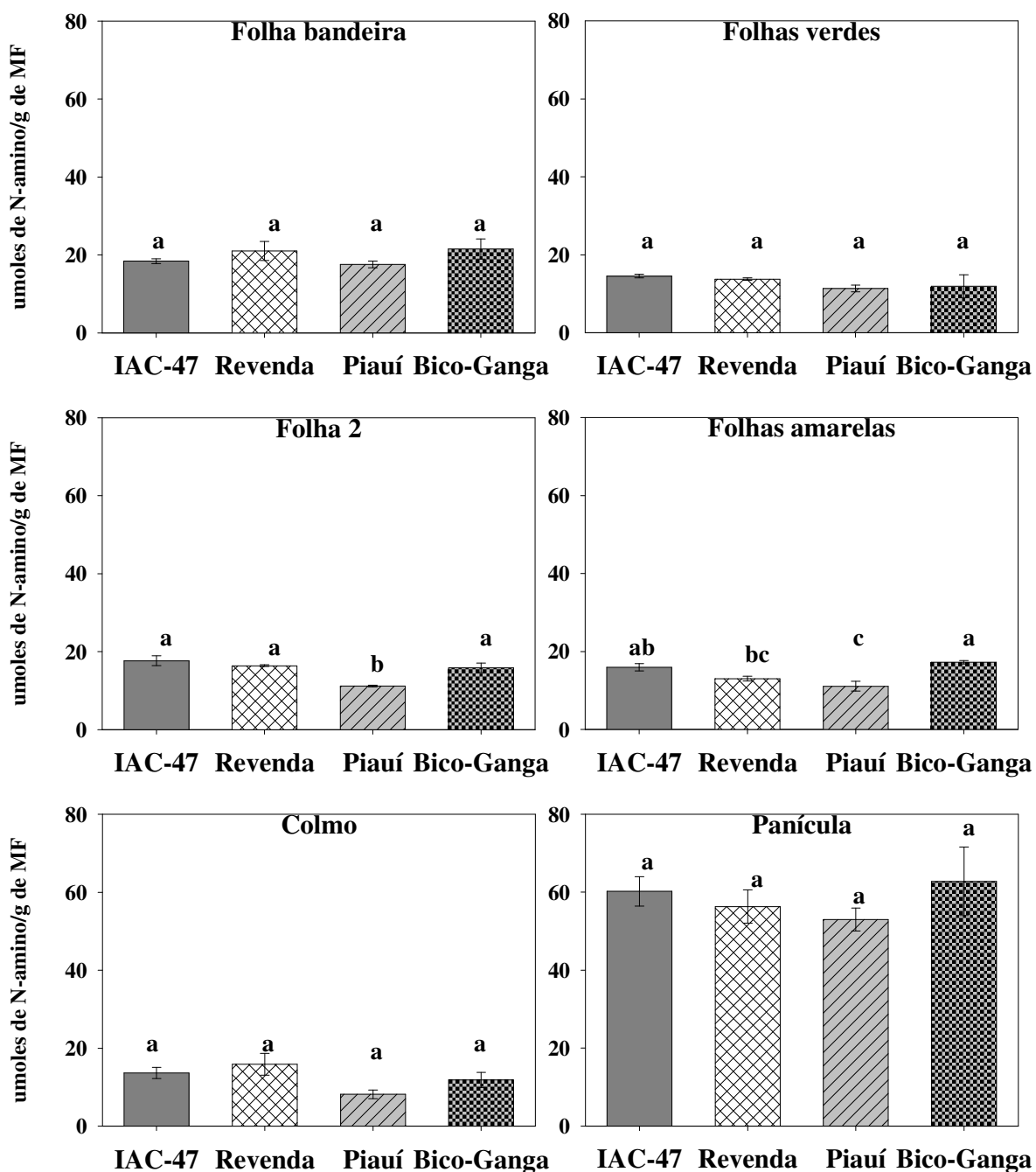


Figura 11. Teores de N-amino livre observados na antese em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

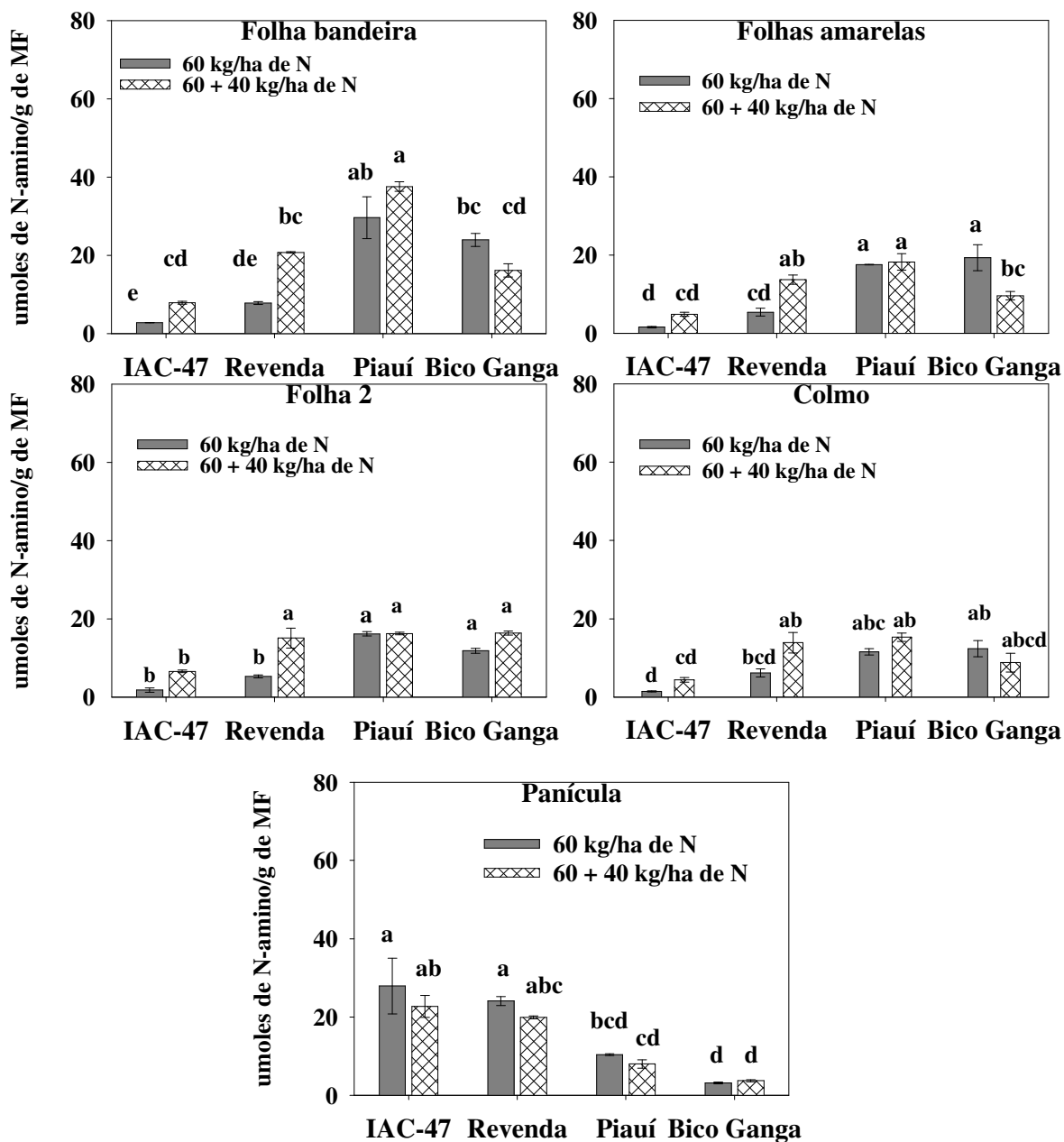


Figura 12. Teores de N-amino livre aos 15 dias depois da antese (DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese). Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Alguns trabalhos (SEEBAUER et al., 2004; CAÑAS et al., 2009) mostram que a síntese e interconversão de aminoácidos é de grande importância para o desenvolvimento de sementes. Portanto, esse comportamento de variedades locais de arroz pode indicar maior capacidade de absorção de nutrientes por essas variedades no período posterior a antese. Isso é interessante para a maior eficiência de uso de nitrogênio, ou maior capacidade de remobilização de N, uma vez que esses teores de N-amino observados, principalmente nas folhas, podem ser resultantes da síntese de aminoácidos para remobilização a partir das reservas de proteínas existentes nos tecidos.

Atenção especial deve ser dada às panículas na coleta realizada na antese, que apresentaram valores bastante elevados quando comparados as demais partes das plantas em todas as variedades (Figura 11). Esses resultados demonstram o início da remobilização de N para os grãos, sendo que o acúmulo de N-amino de extrema importância para a formação de proteínas nos grãos.

O conteúdo de N-amino nos tecidos (Figura 13) foi semelhante nas folhas, com exceção das folhas amarelas, e colmo. Nas folhas amarelas houve diferenças no comportamento quando se comparam as concentrações aos conteúdos de N-amino principalmente nas variedades Piauí e Bico Ganga (Figura 13). Quanto às panículas foi observado que as diferenças de produção de massa seca levaram as grandes diferenças entre os teores e conteúdo de aminoácidos, principalmente no período da Antese (Figuras 4, 10, 11, 12 e 13).

Os teores de $N-NH_4^+$ observados foram equivalentes a condições normais de cultivo, não indicando grande acúmulo de NH_4^+ nas plantas, na coleta realizada aos 15 DAA (Figura 14). Os maiores teores de $N-NH_4^+$ foram encontrados nas variedades IAC-47 e Revenda na coleta ocorrida aos 15 DAA (Figura 14), que diferiram significativamente das demais variedades em todas as partes das plantas. Os teores mais elevados de NH_4^+ observados na variedade melhorada de arroz quando comparada às variedades locais demonstram a tendência dessa variedade em absorver e metabolizar prontamente o N disponível. Esse é um comportamento esperado em variedades melhoradas para resposta ao uso de fertilizantes. Esses valores correlacionam-se com os menores valores de $N-NO_3^-$ para a variedade IAC-47, evidenciando a preferência dessa variedade em reduzir e metabolizar o NO_3^- presente em vez direcioná-lo para reserva no vacúolo.

A maior atividade da nitrato redutase, já discutida anteriormente, apresentada pela variedade IAC-47 na coleta realizada aos 15 DAA, pode ser utilizada para comprovar a pronta metabolização do N disponível. Os dados de conteúdo de $N-NH_4^+$ refletem os maiores teores de amônio das variedades IAC-47 e Revenda, demonstrando acúmulo de cerca de 240 umoles de $N-NH_4^+$ no colmo (Figura 15). Por ser uma forma de N rapidamente metabolizada nos tecidos devido a sua toxidez em plantas e por apresentarem níveis normais na coleta realizada aos 15 DAA, os teores de $N-NH_4^+$ não parecem influenciar a remobilização de N para os grãos no período reprodutivo do ciclo de desenvolvimento das plantas de arroz. No entanto, é interessante notar o metabolismo das plantas com relação ao amônio no período que antecede a antese para a identificação de comportamento em resposta a adubação nas diferentes variedades.

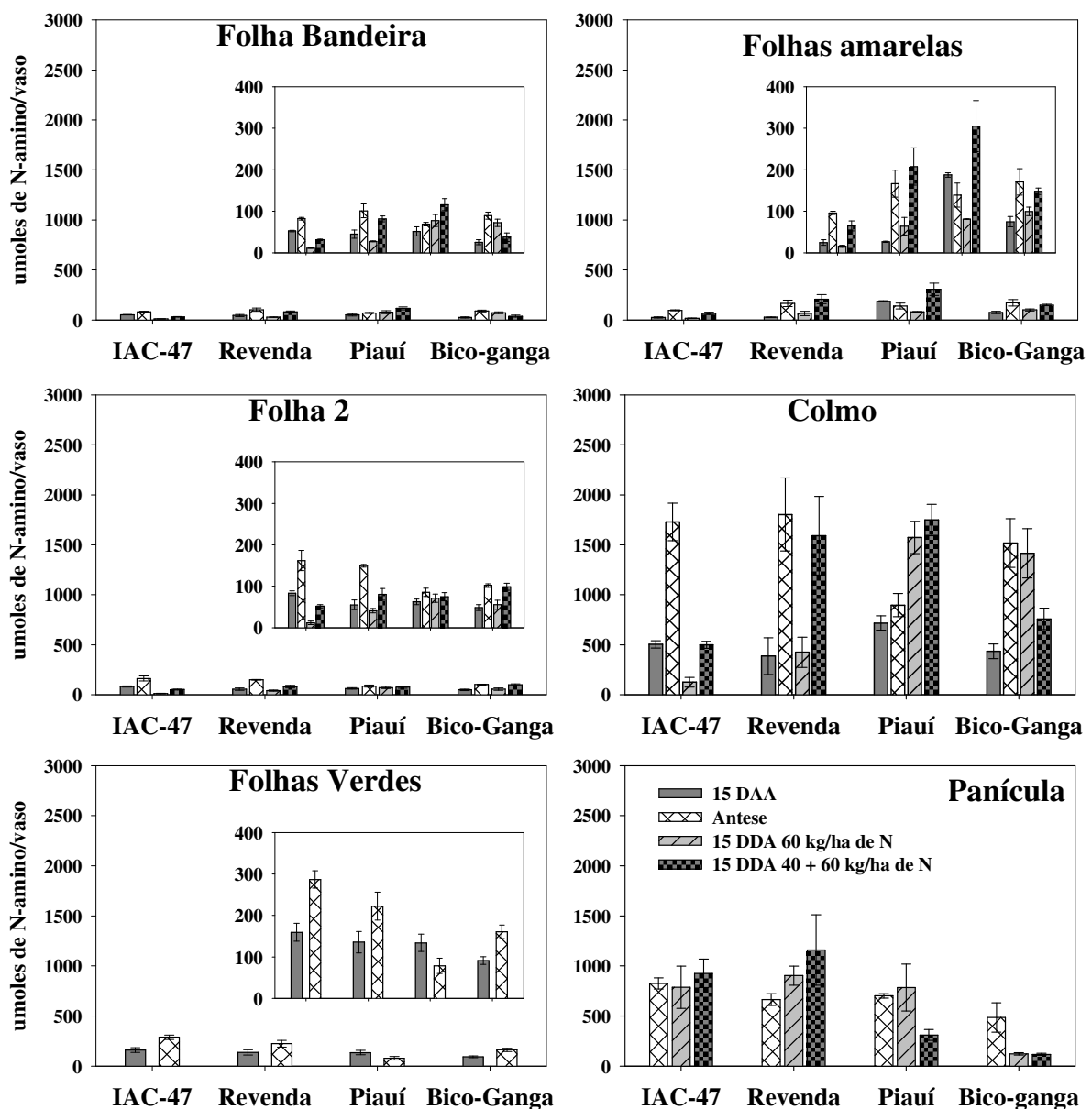


Figura 13. Conteúdo de N-amino (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

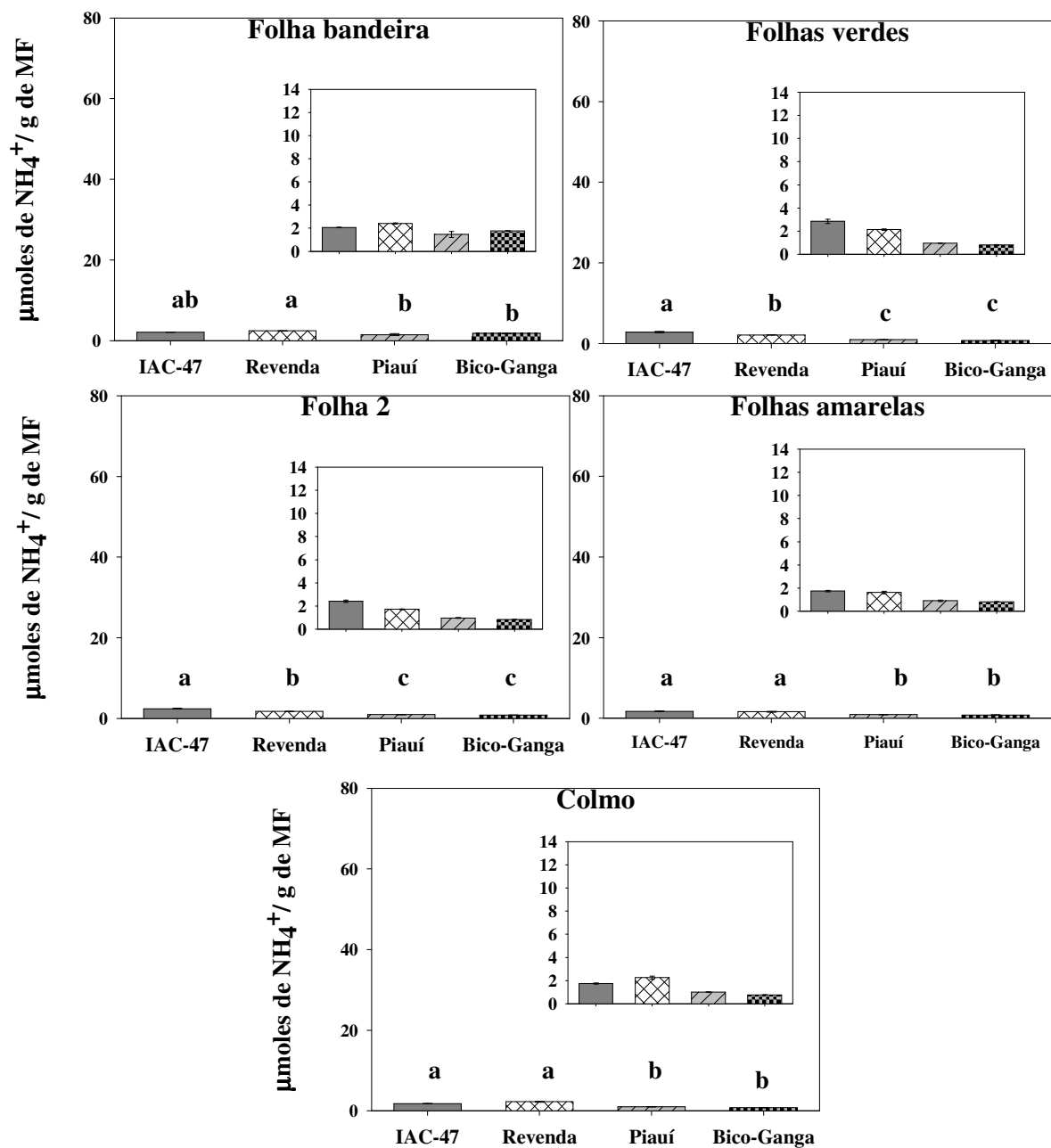


Figura 14. Teores de N-NH₄⁺ observados aos 15 dias antes da antese (DAA) em diferentes partes das plantas de arroz das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas à adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

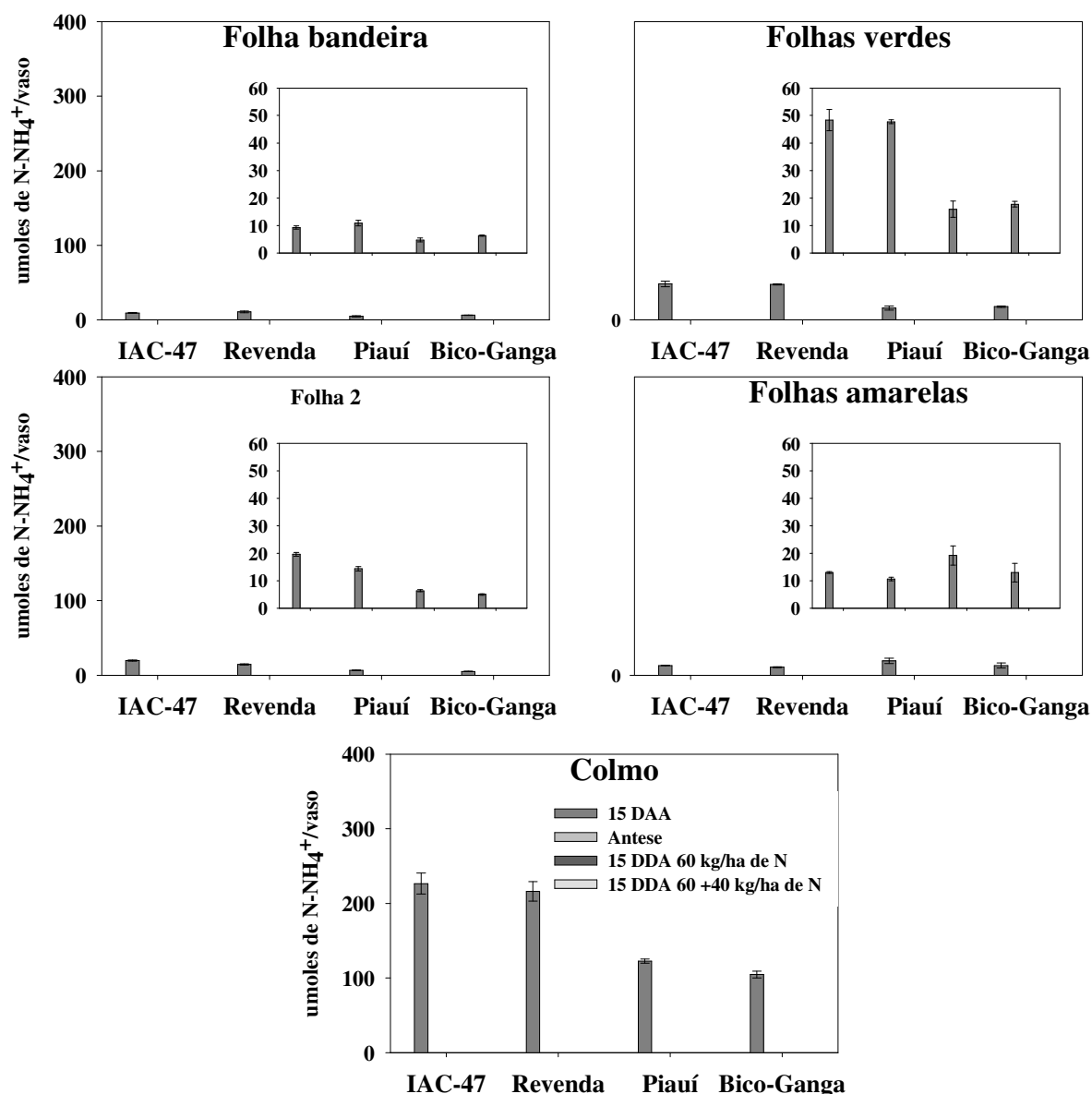


Figura 15. Conteúdo de N-NH₄⁺ (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

Altos teores de açúcares solúveis nos tecidos estão relacionados a disponibilidade de energia para reações do metabolismo, os maiores teores foram observados nas variedade IAC-47 nas folhas bandeira, folhas 2, folhas amarelas e colmo aos 15 DAA. BUCHER (2007) observou aumento nos teores de açúcares solúveis em folhas de variedades de arroz submetidas a tratamento sem N em um período entre 0 e 9 horas, quando as plantas foram receberam a 0,15mM de NO₃⁻ os teores permaneceram constantes e diminuíram em plantas submetidas a tratamento de 5 mM de NO₃⁻.

Os maiores teores de açúcares solúveis observados nas folhas 2, folhas amarelas e colmo na variedade IAC-47 nas coletas realizada aos 15 DAA (Figura 16) podem estar

relacionados a maior assimilação do nitrogênio disponível pela variedade IAC-47 no período vegetativo do ciclo de desenvolvimento. Esses resultados são suportados pela maior atividade da nitrato redutase observada nas plantas da variedade IAC-47 aos 15 DAA e pelos menores teores de nitrato observados nessa variedade aos 15 DAA.

No período da antese não foram observadas diferenças significativas para os teores de açúcares solúveis entre as quatro variedades de arroz estudadas nas folhas 2, folhas amarelas, colmo e panículas (figura 17). A variedade Revenda apresentou maiores valores de açúcares solúveis nas folhas bandeira e folhas verdes na coleta realizada no período da antese, da variedade Bico-ganga nas folhas bandeira e demais variedades nas folhas verdes. (Figura 17).

Houve de modo geral diminuição dos teores de açúcares nas folhas e colmo das plantas de todas as variedades analisadas na coleta realizada aos 15 DDA (figura 18) quando comparada à primeira coleta realizada aos 15 dias antes da antese (Figura 16), o que pode estar associado ao gasto de energia para as reações envolvidas na remobilização de N no período de enchimento de grãos. Segundo BARNEIX (2007) um decréscimo na proporção fonte/dreno diminui a concentração de açúcares nas folhas. Esse decréscimo de proporção ocorre no período de remobilização de N, quando os grãos são os principais drenos de compostos advindos dos tecidos vegetais, via remobilização.

Houve pouca influencia da suplementação nitrogenada sobre os teores de açúcares na coleta realizada aos 15 DDA, ocorrendo diferenças significativas para os valores de açúcares solúveis entre as variedades somente nas folhas bandeira, folhas amarelas e colmo. Os maiores valores foram observados nas plantas da variedade IAC-47 que receberam suplementação nitrogenada nas folhas bandeira e amarelas, enquanto no colmo há maiores valores para a variedade Piauí.

Os maiores teores de N-amino livre observados nas folhas da variedade IAC-47 refletem a eficiência dessa variedade em assimilar prontamente o N-disponível por meio da regulação da atividade da enzima NR, que tem como um dos seus controles os produtos gerados a partir da redução do nitrato. Estes resultados também refletem os maiores teores de amônio observados para essa variedade.

Todos os parâmetros analisados refletem a tendência de uma maior adaptação das variedades locais de arroz do estado do Maranhão a condições de cultivo com baixo suprimento de N, destacando-se por apresentar maior capacidade de acúmulo de N nas primeiras etapas do ciclo de desenvolvimento da cultura, característica importante para a fase reprodutiva do ciclo onde ocorre a remobilização de N.

O entendimento dos mecanismos de adaptação das variedades locais de arroz pode levar a obtenção de informações importantes para a obtenção de variedades com maior eficiência de remobilização de N (ERN), o que pode contribuir para o aumento da eficiência de uso de N.

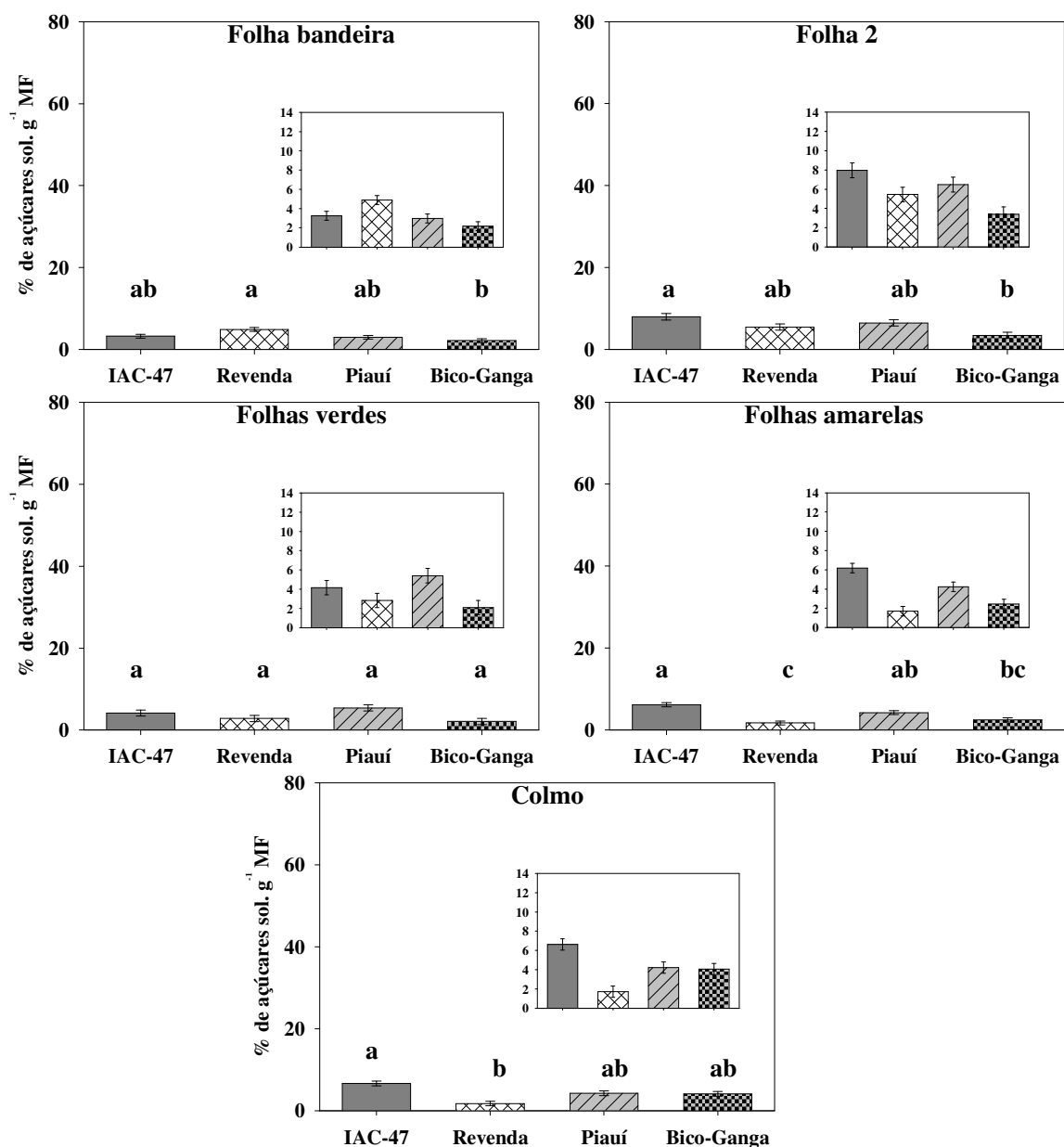


Figura 16. Teores de açúcares observados aos 15 dias antes da antese (DAA) em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

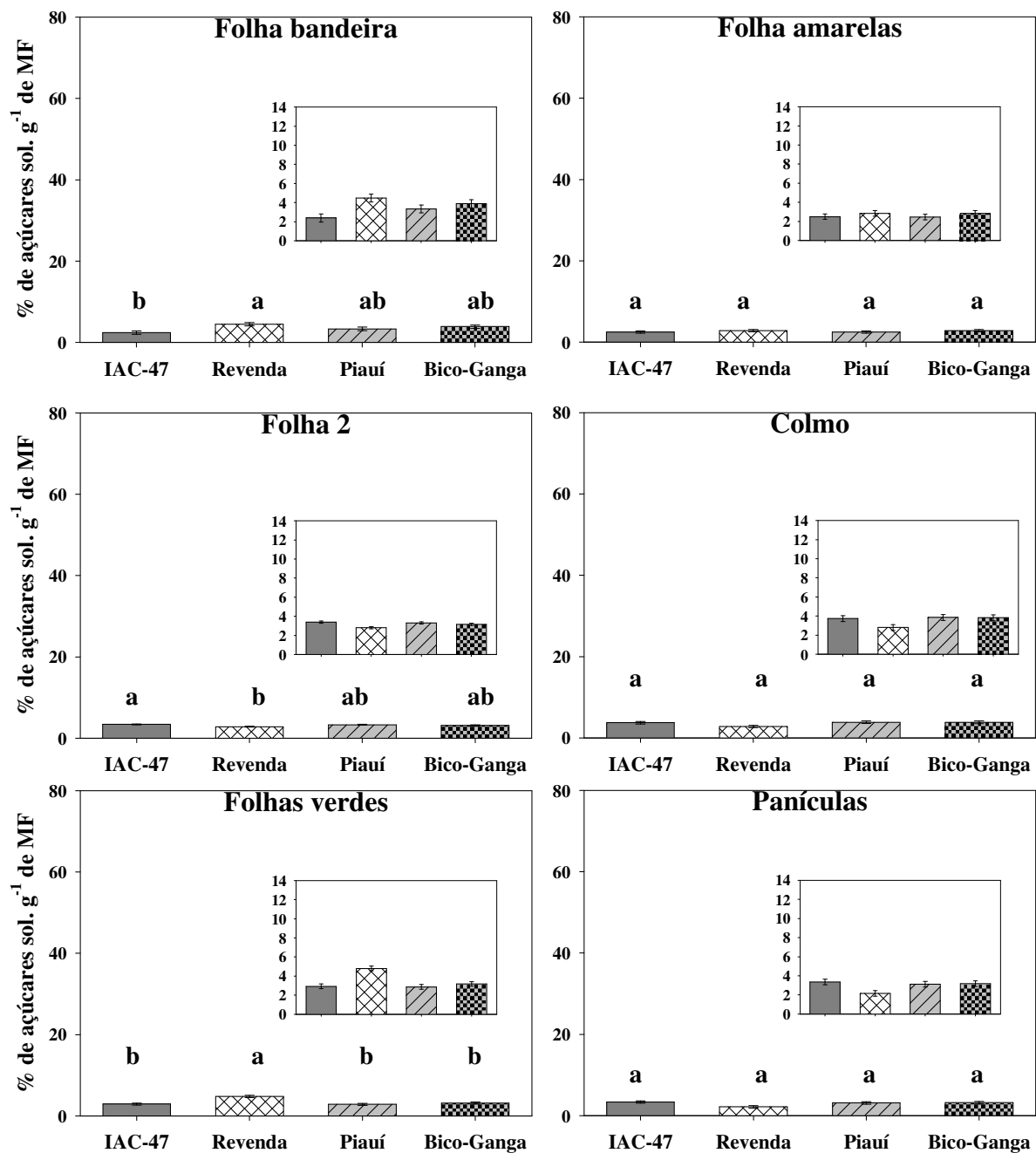


Figura 17. Teores de açúcares solúveis na antese em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

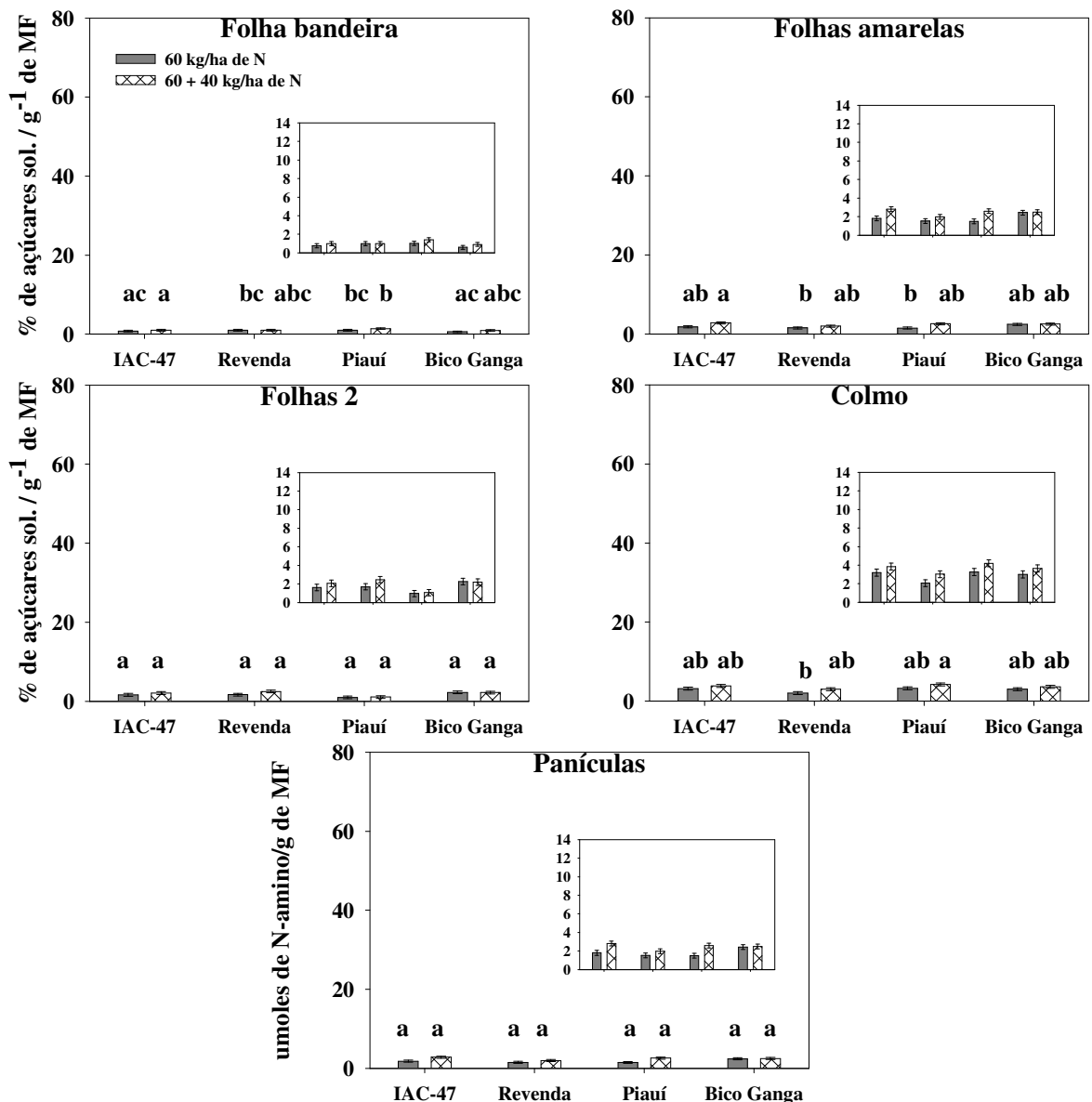


Figura 18. Teores de açúcares solúveis aos 15 dias depois da antese (DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese). Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

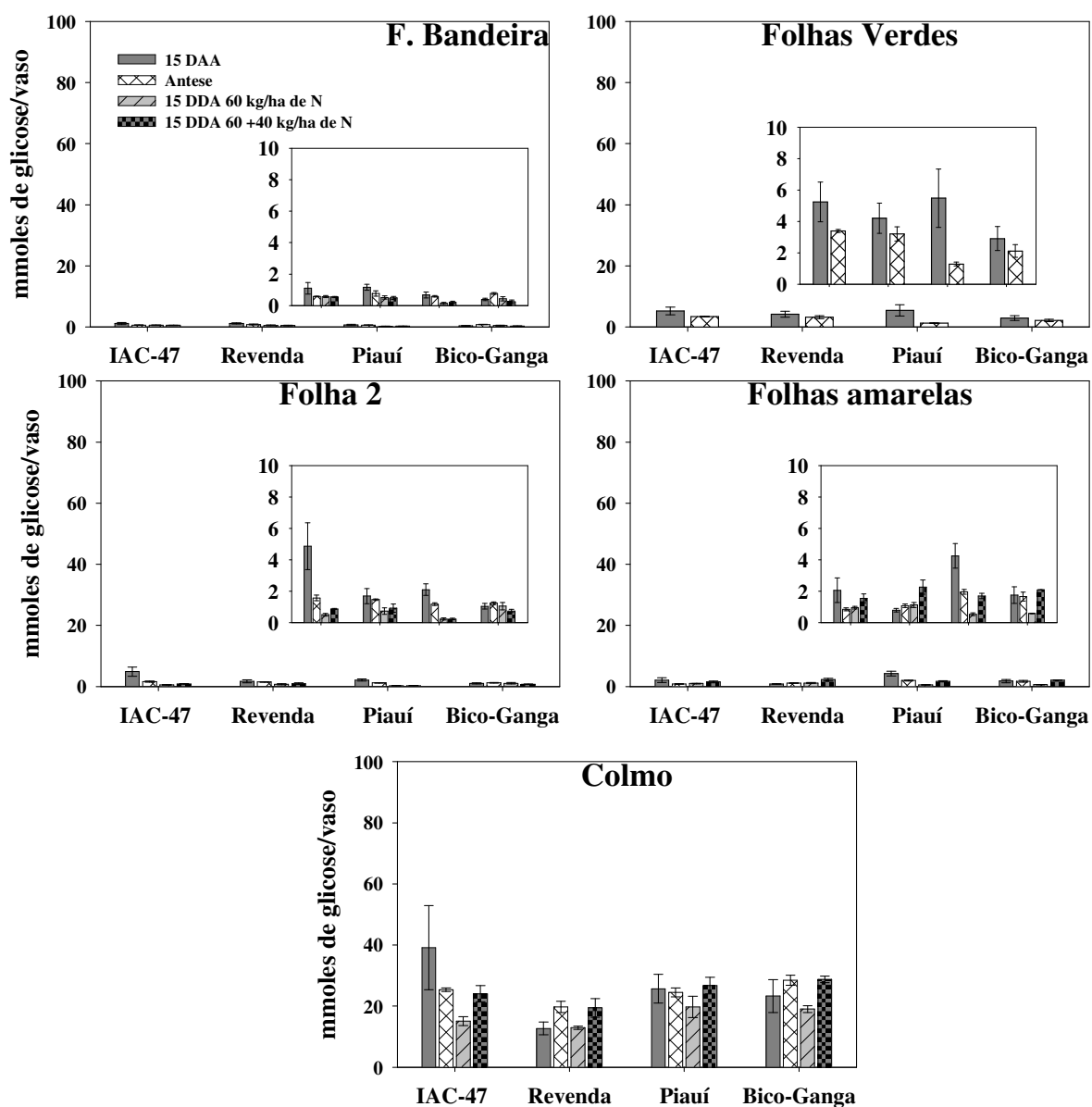


Figura 19. Conteúdo de açúcares (teor x produção de massa fresca) observado aos 15 dias antes da antese (DAA), na antese e aos 15 dias depois da antese (15 DDA) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

4.3 Eficiência de Uso de N das Variedades de Arroz

Não foram observadas diferenças significativas entre as variedades estudadas com relação ao peso de grãos cheios (Tabela 2). Isto indica que as diferenças nos teores de proteína dos grãos entre as variedades devem estar relacionadas principalmente aos teores de N nos grãos, e não a um possível efeito de diluição como já reportado em alguns trabalhos que citam a relação genética negativa entre produção de grãos e concentração de proteína nos grãos. Essa relação negativa deve-se à competição entre as vias de síntese de proteína e de carboidratos. Há duas hipóteses que explicam as bases fisiológicas dessa correlação, a de

MUNIER-JOLAIN e SALON (2005), que se baseia na competição entre carbono e nitrogênio por energia e a de ACRECHE e SLAFER (2009), que se baseia em um efeito de diluição de N pelos compostos baseados em carbono.

Quando se avalia a interação variedade x tratamento para o peso de grãos cheios observa-se que a suplementação nitrogenada não promoveu grandes diferenças com relação a esse parâmetro (Tabela 2), com exceção da variedade Bico-ganga, que apresentou menor peso de grãos nas plantas submetidas ao tratamento com suplementação nitrogenada, diferindo significativamente das plantas que não receberam suplementação. FERRAZ JÚNIOR (1993) também observou tendências de redução de produção de grãos na variedade bico-ganga, assim como na IAC-1278 e aumento nas cultivares Revenda, agulha e IAC-25 quando submetidas a tratamento com suplementação nitrogenada. O fato das demais variedades não ter demonstrado grandes diferenças quanto à produção de espiguetas com relação aos tratamentos com adubação nitrogenada está de acordo com resultados observados por SOUZA (1995) e FERRAZ JÚNIOR (1993), onde a suplementação nitrogenada não influenciou o peso de grãos e a produtividade.

Podem ser observadas diferenças significativas entre os conteúdos de N na parte aérea e grãos entre as variedades quando se leva em consideração a interação entre tratamento e variedade (Tabela 2), demonstrando que neste experimento a suplementação nitrogenada influenciou o conteúdo de N-total na parte aérea e nos grãos. Essa influencia da suplementação sobre o conteúdo de N nos grãos e parte aérea reflete os maiores valores de teores de proteínas nos grãos (Figura 20) das plantas submetidas à suplementação nitrogenada de todas as variedades estudadas quando comparadas as plantas que não receberam suplementação. Observam-se diferenças significativas entre os teores de proteínas nos grãos levando em consideração as plantas das variedades Revenda, Piauí e Bico-ganga, apenas as plantas da variedade IAC-47 submetidas ao tratamento com suplementação nitrogenada não apresentaram diferenças nos teores de proteínas nos grãos quando comparadas as plantas submetidas ao tratamento sem suplementação.

Tabela 2. Peso de grãos (g/vaso) e conteúdo de N na parte aérea e grãos (mg/vaso) ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a apenas à adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) ou a adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação complementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese.

Variedades	Tratamentos (kg/ha de N)	Peso de grãos cheios			Conteúdo de N na parte aérea			Conteúdo de N nos grãos		
		(g/vaso)	±EP	±EP	(mg/vaso)	±EP	(mg/vaso)	±EP		
Piauí	60	24,38	Aab*	1,72	484,17	Be	8,68	303,84	ABb	6,03
	60+40	26,30	Aab	0,75	626,29	Babc	16,95	408,84	ABa	2,04
IAC-47	60	24,54	Aab	1,57	600,93	Abcd	37,86	341,35	Ab	23,43
	60+40	27,78	Aa	0,60	722,62	Aa	10,57	430,00	Aa	2,70
Revenda	60	28,16	Aa	1,55	535,00	ABcde	9,39	352,93	Ab	11,08
	60+40	27,97	Aa	0,77	686,50	ABab	17,04	423,26	Aa	7,48
Bico-ganga	60	29,04	Aa	2,16	512,79	Bde	25,89	321,00	Bb	12,24
	60+40	23,04	Ab	2,51	619,73	Bbc	15,45	346,65	Bb	10,57

*Letras maiúsculas diferem entre variedades nas linhas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas diferem entre tratamentos nas linhas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. ±EP (erro padrão).

Menor teor de proteína nos grãos ocorreu na variedade Bico-ganga, diferindo significativamente das demais variedades (Figura 20). Não foram observadas diferenças significativas de teores de proteínas entre as variedades IAC-47, Revenda e Piauí (Figura 20).

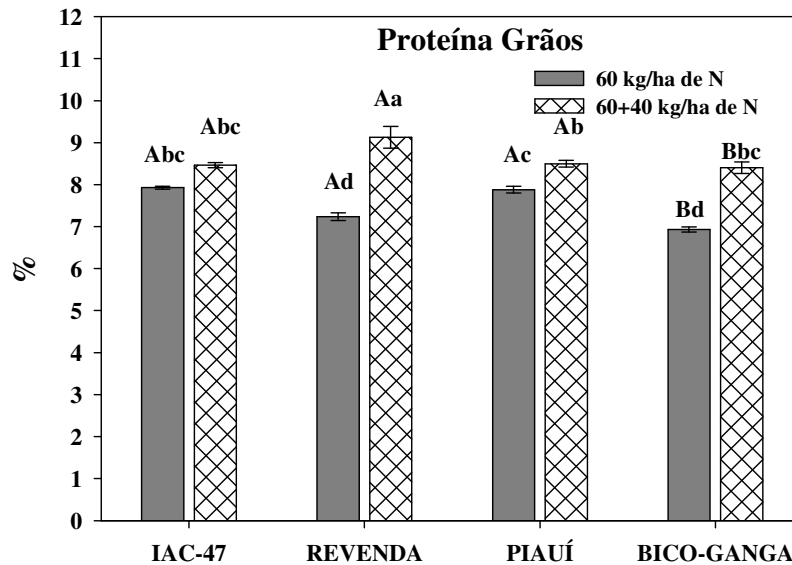


Figura 20. Teor de proteína nos grãos no final do ciclo de desenvolvimento nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Píauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados de maiores teores de proteínas nas plantas que receberam suplementação nitrogenada quando comparadas as que não receberam, como consequência da influência da suplementação sobre o conteúdo de N-total na parte aérea e grãos das plantas submetidas aos tratamentos de 60 + 40 kg/ha de N, estão de acordo com SOUZA (1995). FERRAZ JÚNIOR (1993) trabalhando com 50 cultivares de arroz observou que a maior percentagem de aumento de proteína com aplicação de suplementação nitrogenada foi na variedade Bico-ganga.

A suplementação nitrogenada gera efeitos sobre a senescência das plantas, retardando-a e mantendo os níveis fotossintéticos por período mais prolongado, além de aumentar os teores de N-solúvel. BOGARD et al. (2010) verificou que sob diversos ambientes a concentração de proteínas para grãos (CPG) de trigo foi significativamente relacionado com absorção de N pós-antese, independentemente da data da antese e teor de N-total no período. Esse autor observou que a absorção de N pós-antese tem um efeito predominante sobre o CPG, sendo que essa absorção é independente da data de antese e correlaciona-se negativamente com a remobilização de N.

Segundo BARNEIX (2007) há muitos fatores interagindo com a absorção e remobilização de nitrogênio pelas plantas, que podem ser fatores ambientais como água e temperatura, ou intrínsecos da planta, como número de grãos e perfilhos e índice de área foliar. Trabalhos têm demonstrado que a CPG também pode ser aumentada pela maior remobilização de N ocasionada pela aceleração da senescência (UAUY et al., 2006). Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na relação entre absorção e remobilização de N pós-antese pode ajudar na identificação de mecanismos associados a EUN por diferentes variedades.

Os maiores valores de conteúdo de N na parte aérea foram observados nas variedades IAC-47e Revenda quando submetidas ao tratamento com suplementação nitrogenada (Tabela

2) apresentado diferenças significativas quando comparadas com as variedades Piauí e Bico-ganga, que não apresentaram diferenças significativas ente si, e com plantas da mesma variedades submetidas ao tratamento sem suplementação nitrogenada (Tabela 2). Os menores valores de conteúdo de N na parte aérea foram observados na variedade Piauí quando submetida ao tratamento sem suplementação nitrogenada.

Os valores mais elevados de conteúdo de N na parte aérea da variedade IAC-47 evidenciam a característica dessa variedade ser mais responsiva a suplementação nitrogenada que as demais, o que pode ser atribuído ao fato de sua melhoria genética para resposta a adubação nitrogenada. Esses maiores valores de N na parte aérea das plantas correlacionam-se positivamente com os valores de conteúdo de N nos grãos observados nessa variedade para o tratamento com suplementação nitrogenada. O mesmo comportamento foi observado para a variedade revenda submetida a suplementação nitrogenada. Da mesma forma os menores valores de conteúdo de N na parte aérea apresentados pela variedade Bico-ganga para ambos os tratamentos relacionam-se aos menores valores de conteúdo de N nos grãos e teor de proteína dos grãos dessa variedade.

Torna-se interessante observar que a variedade Bico-ganga apresentou menor índice de colheita de grão e menor teor de proteína nos grãos. FERRAZ JÚNIOR (1993) observou correlações negativas mais intensas entre ICG e PB, no grupo de cultivares locais de arroz do estado do maranhão de alto teor de PB nos grãos, que foram acompanhadas de fortes correlações positivas entre ICG e produção de grãos.

A resposta das variedades IAC-47 e Revenda a adubação nitrogenada está relacionada a uma maior capacidade de absorção de N (Figura 21C). Apesar dos maiores valores de conteúdo de N nos grãos na variedade IAC-47 (Tabela 2) quando submetida a suplementação nitrogenada os maiores valores de proteína nos grãos foram observados para a variedade Revenda quando submetida ao mesmo tratamento (Figura 20). Este fato pode estar relacionado a maiores valores de EUtN e EUN observados para essa variedade (Figuras 21B e 21D).

Apesar dos menores valores de EAN observados na variedade Piauí (Figura 21 C) houve maior índice de colheita de N, enfatizando a capacidade das variedades locais de arroz do estado do Maranhão direcionarem mais eficientemente o N absorvido para os grãos que variedades melhoradas.

Os maiores valores de EUN foram observados para as variedades de arroz locais do estado do Maranhão, com destaque para a variedade Revenda no tratamento sem suplementação nitrogenada. Ao se analisar a interação variedade x tratamento observa-se diferenças significativas entre as plantas da mesma variedade que receberam suplementação nitrogenada para a EUN. Os parâmetros analisados evidenciam uma maior EUN das variedades locais de arroz do estado do Maranhão, o que está relacionado principalmente a uma utilização mais eficiente desse nutriente por essas variedades.

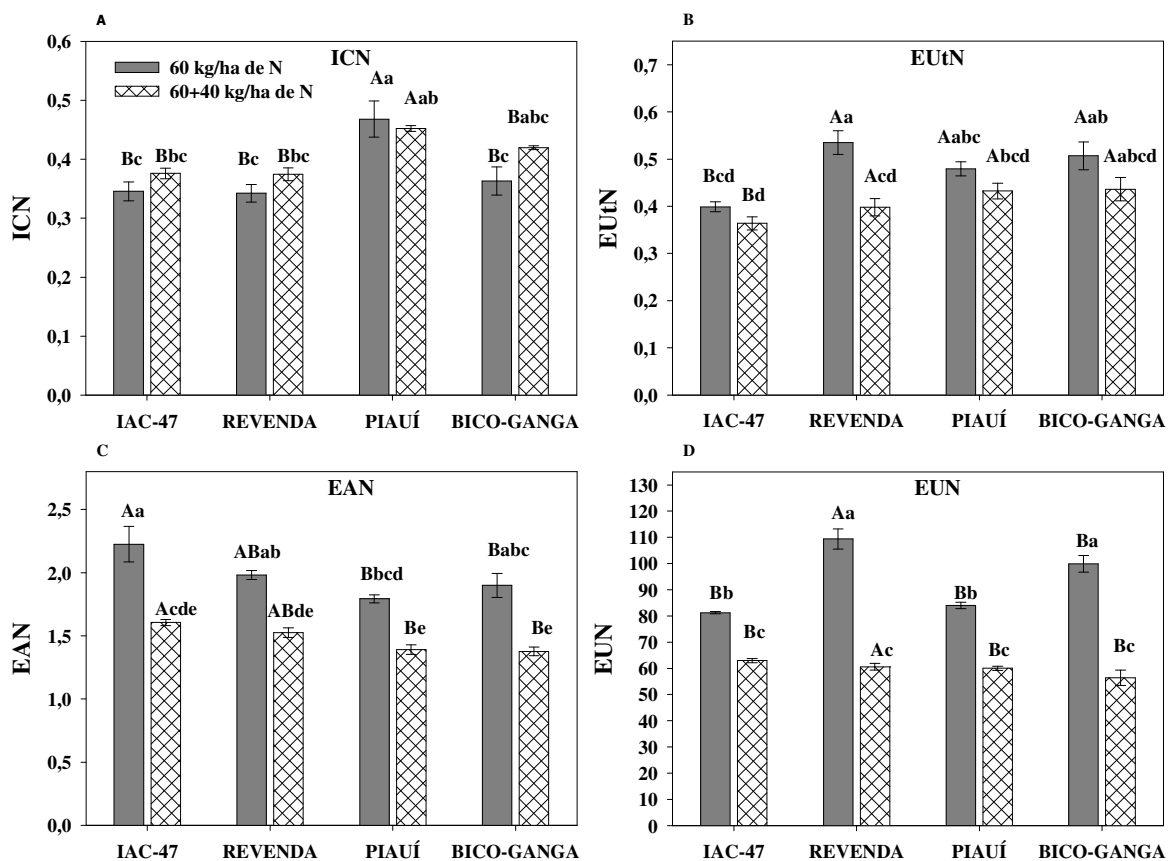


Figura 21. (A) Índice de colheita de N (N grãos/N total da parte aérea), (B) Eficiência de utilização de N (produção de espiguetas/conteúdo de N na parte aérea), (C) Eficiência de absorção de N (conteúdo de N na parte aérea/N fornecido) e (D) Eficiência de Uso de N (produção de espiguetas/N fornecido) das quatro variedades no final do ciclo de desenvolvimento das plantas. Letras maiúsculas diferem entre variedades entre colunas e letras minúsculas entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.4 Atividade de Glutamina Sintetase

A atividade da GS nas três coletas realizadas pode ser associada à isoforma GS1, que é mais abundante e apresenta maior atividade na fase reprodutiva do ciclo de crescimento das plantas (Figuras 22, 23 e 24). Esses resultados estão de acordo com a análise de expressão gênica (Figuras 25), que identificou a maior expressão da isoforma GS1.1 em todas as coletas principalmente para a variedade Piauí. LOTHIER et al. (2011) em trabalho com *Arabidopsis thaliana* verificou que a maioria das proteínas GS1 em folhas de plantas sob baixa suplementação nitrogenada não foram codificadas por *GLN1.2* e ainda que *GLN1.4* e *GLN1.1* são mais importantes para plantas sob baixa suplementação nitrogenada. Os resultados desses LOTHIER et al. (2011) corroboram com os de maior afinidade de *GLN1.1* e *GLN1.4* por amônio descrita por ISHIYAMA et al. (2004) afirmam que a glutamina sintetase citossólica é crucial para a produção de proteína derivada da remobilização de nitrogênio.

Verificou-se maior atividade de GS nas variedades Piauí e bico-ganga em todas as partes das plantas nas coletas realizadas aos 15 DAA (Figura 22) e na antese (Figura 23), com exceção das folhas amarelas da variedade Piauí na antese. Na coleta realizada no período da antese destacou-se a atividade cerca de 3, 5 vezes maior no colmo da variedade Bico-Ganga (Figuras 22 e 23). É interessante a identificação da maior atividade de GS principalmente na variedade local de arroz Piauí, evidenciando maior eficiência de remobilização de N.

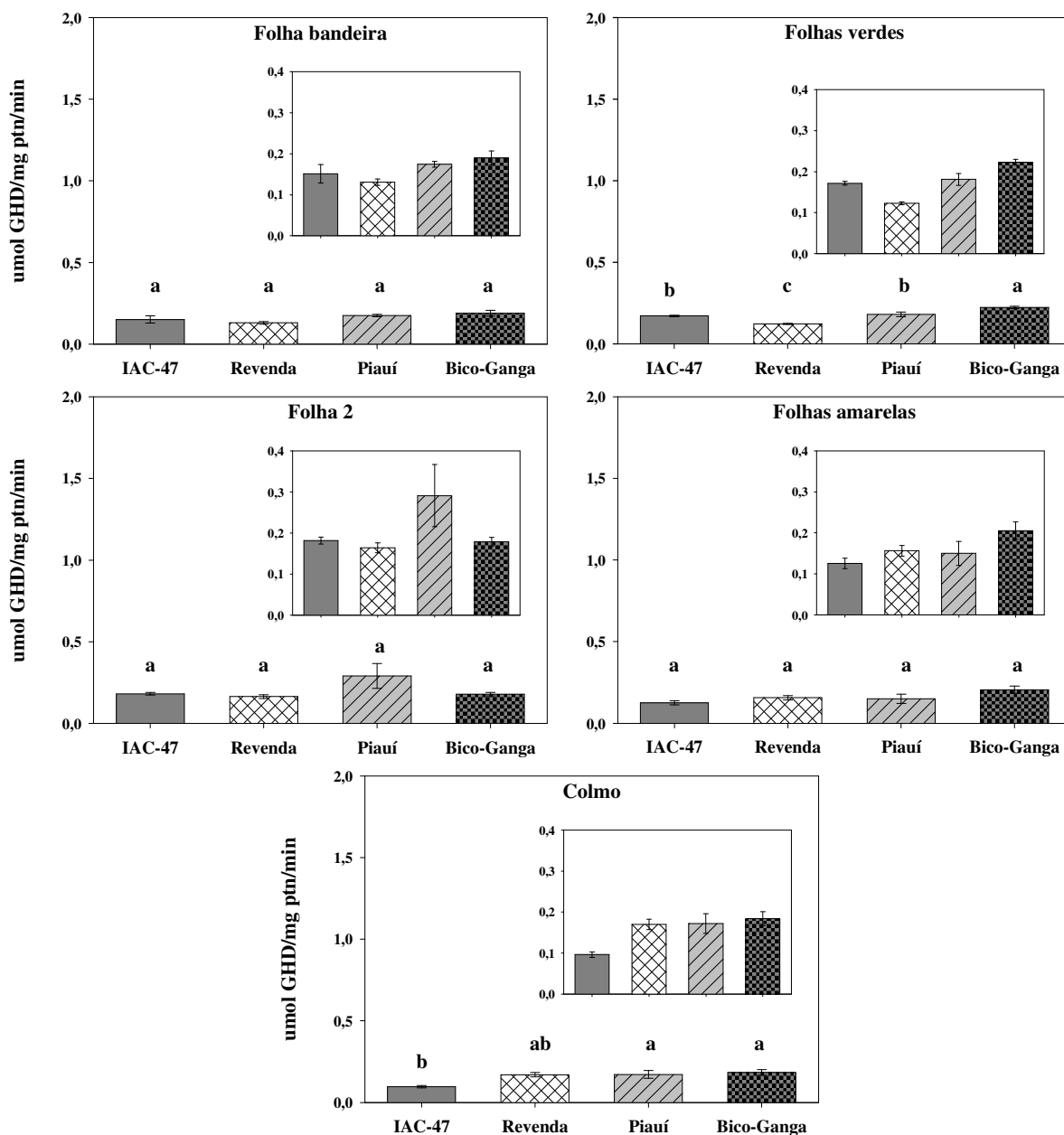


Figura 22. Atividade de GS observada aos 15 DAA em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

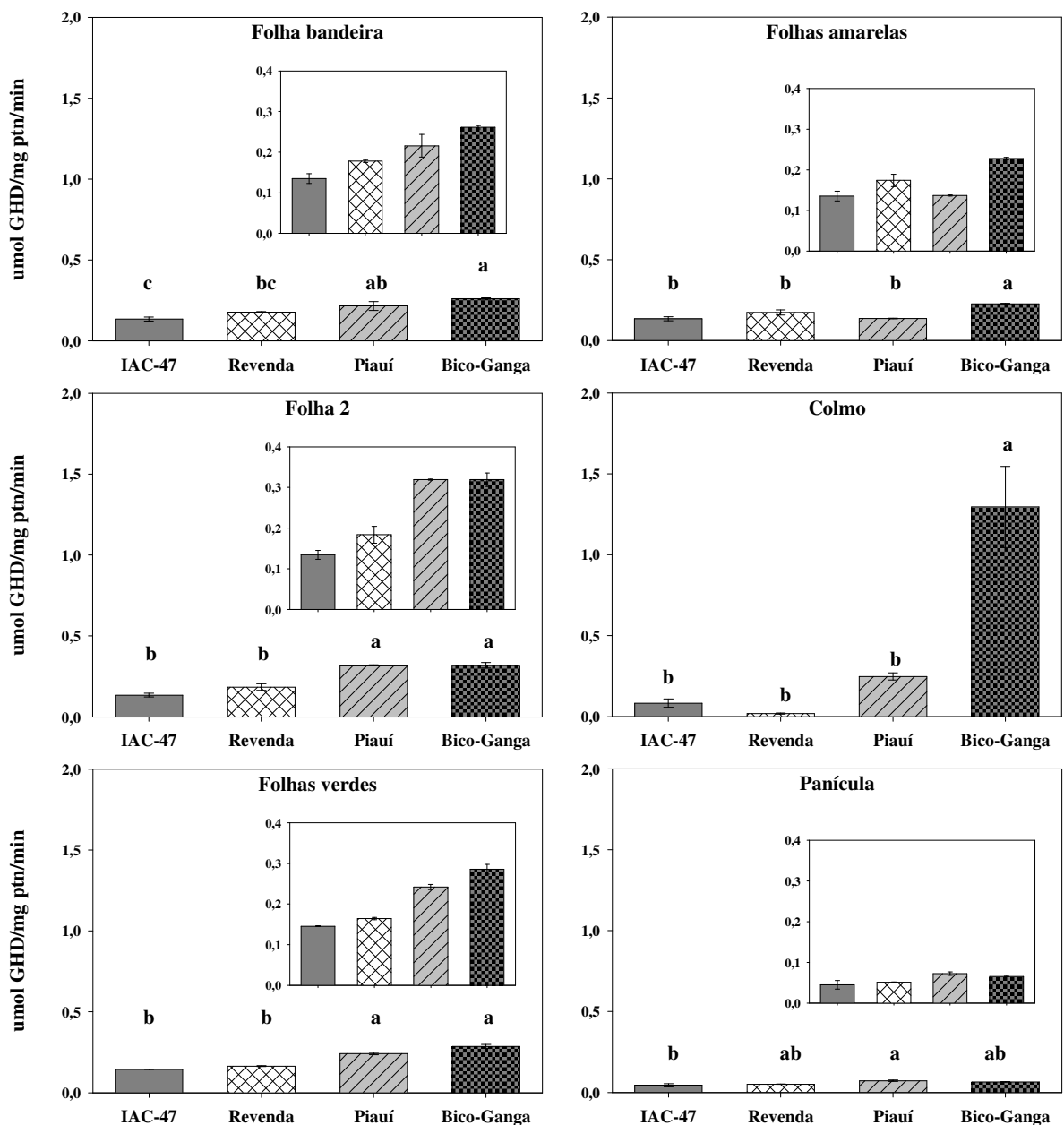


Figura 23. Atividade de GS no período da antese observada em diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico Ganga e Revenda) e na variedade melhorada (IAC-47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio. Letras minúsculas nas colunas diferem entre tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

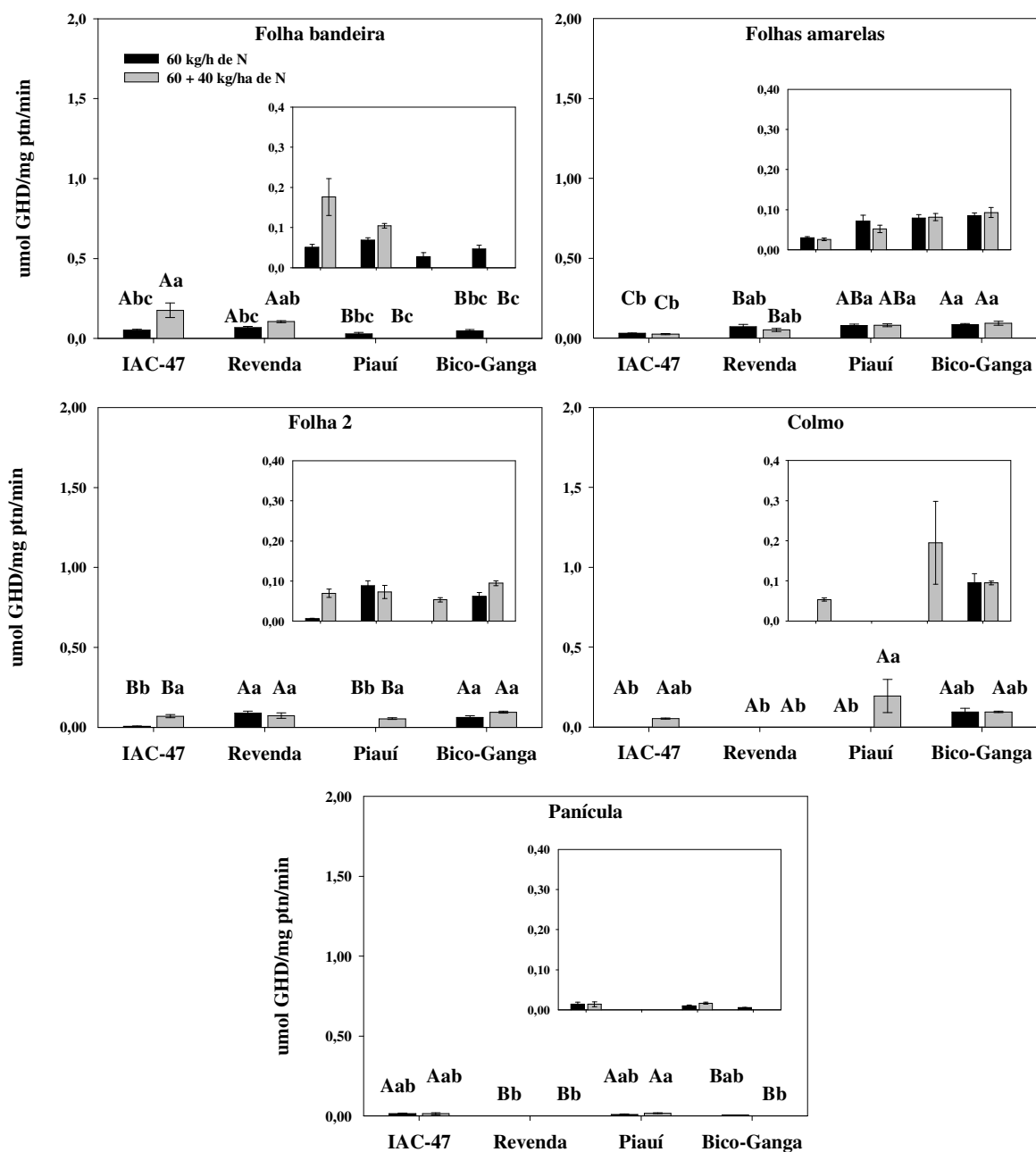


Figura 24. Atividade de GS aos 15 DDA nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese. Letras maiúsculas nas colunas diferem entre variedades pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Letras minúsculas nas colunas diferem entre interação tratamento x variedade pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os autores CAI et al. (2009) verificaram aumento nos níveis metabólicos em plantas superexpressando GS, que mostraram alta atividade de GS total e concentração de proteínas solúveis em folhas, e altos níveis de aminoácidos e N-total em toda a planta. HABASH et al. (2006) trabalhando com plantas de trigo, verificaram correlação positiva entre conteúdo de N em grãos e tecidos e atividade total de GS nas folhas, incluindo a isoforma cloroplástica e citossólica. Não se pode fazer a mesma afirmação com os resultados obtidos neste

experimento, já que a variedade que apresentou melhores resultados com relação ao teor de N nos grãos e tecidos, Revenda, demonstrou em geral menores valores de atividade de GS em todas as coletas realizadas (Figuras 22, 23 e 24).

Na coleta realizada aos 15 DDA (Figura 24) as plantas já se encontravam em um estado mais acelerado de senescência e com os tecidos mais fibrosos, além dos grãos já estarem pastosos ou duros. Essa característica das amostras pode ter influenciado a eficiência de extração das proteínas, o que gerou grandes diferenças de atividade da GS nessa coleta, em alguns casos não foi verificada atividade da enzima. No entanto, observou-se uma diminuição da atividade da GS na coleta realizada aos 15 DDA (Figura 24) quando comparada com a atividade nas coletas anteriores. SOUZA (1995) também observou uma diminuição da atividade de GS no período de enchimento dos grãos. Essa diminuição da atividade de GS deve-se principalmente a queda nos níveis da isoforma GS2, cloroplástica, que contribui com grande parte da atividade de GS total no período vegetativo do ciclo de desenvolvimento das plantas, tendo sua atividade reduzida com o início do período de remobilização.

Houve aumento de atividade de GS nas folhas bandeira da variedade Piauí quando submetida ao tratamento com suplementação nitrogenada (Figura 24), fato contrário foi observado na variedade revenda, onde ocorreu diminuição dos valores de atividade. A diminuição da atividade com suplementação nitrogenada foi observada também em todas as partes da variedade Bico-Ganga (Figura 24).

As menores atividades de GS nas variedades locais de arroz quando comparadas a variedade IAC-47 nas coletas realizadas aos 15 DAA (Figura 22) e antese (Figura 23) associados a uma maior expressão de *OsGln1.1* na variedade Piauí pode indicar maior atividade de remobilização de N por parte dessa variedade de arroz.

4.5 Expressão dos Genes *OsGS1.1*, *OsGS2* e *OsGS1.3* ao Longo do Ciclo de Desenvolvimento das Plantas

Foram observados maiores valores de expressão do gene *OsGS1.1* na variedade Piauí nas folhas 2 quando comparadas à variedade IAC-47 aos 15 DAA e nas folhas bandeira e folhas 2 na ocasião da antese (Figura 25). Esses resultados são interessantes uma vez que esse gene codifica para a enzima GS1, que é a isoforma citossólica. Essa enzima apresenta grande importância no processo de remobilização de nitrogênio, uma vez que sua atividade aumenta com a senescência e ela está relacionada ao processo de formação de aminoácidos glutamina para posterior remobilização a partir de tecidos considerados fonte de N.

Não foram observadas diferenças significativas na expressão de gene *OsGS2* entre as variedades aos 15 DAA na folha bandeira e folha 2, no período da antese também não foram observadas diferenças de expressão desse gene entre as variedades (Figura 25).

Nas panículas não foram observadas diferenças de expressão do gene *OsGS1.1* no período da antese (Figura 25). Quanto ao gene *OsGS2* foi observada uma maior expressão na variedade IAC-47. O gene *OsGS2* codifica para a isoforma plastidial GS2, que apresenta maior importância no período vegetativo do ciclo de desenvolvimento da planta, geralmente apresentando diminuição de sua atividade no período de remobilização de nutrientes.

A expressão do gene *OsGS1.3*, foi observada apenas nas panículas, ou seja, no período de desenvolvimento reprodutivo das plantas. Foi observada maior expressão desse gene na variedade IAC-47 no período da antese (Figura 26). Resultado interessante em relação a esse gene é observado na coleta realizada aos 15 dias depois da antese, onde sua expressão foi cerca de cinco vezes maior na variedade Piauí no tratamento sem suplementação nitrogenada quando comparada à variedade IAC-47 e as plantas da variedade Piauí que receberam suplementação nitrogenada (Figura 26).

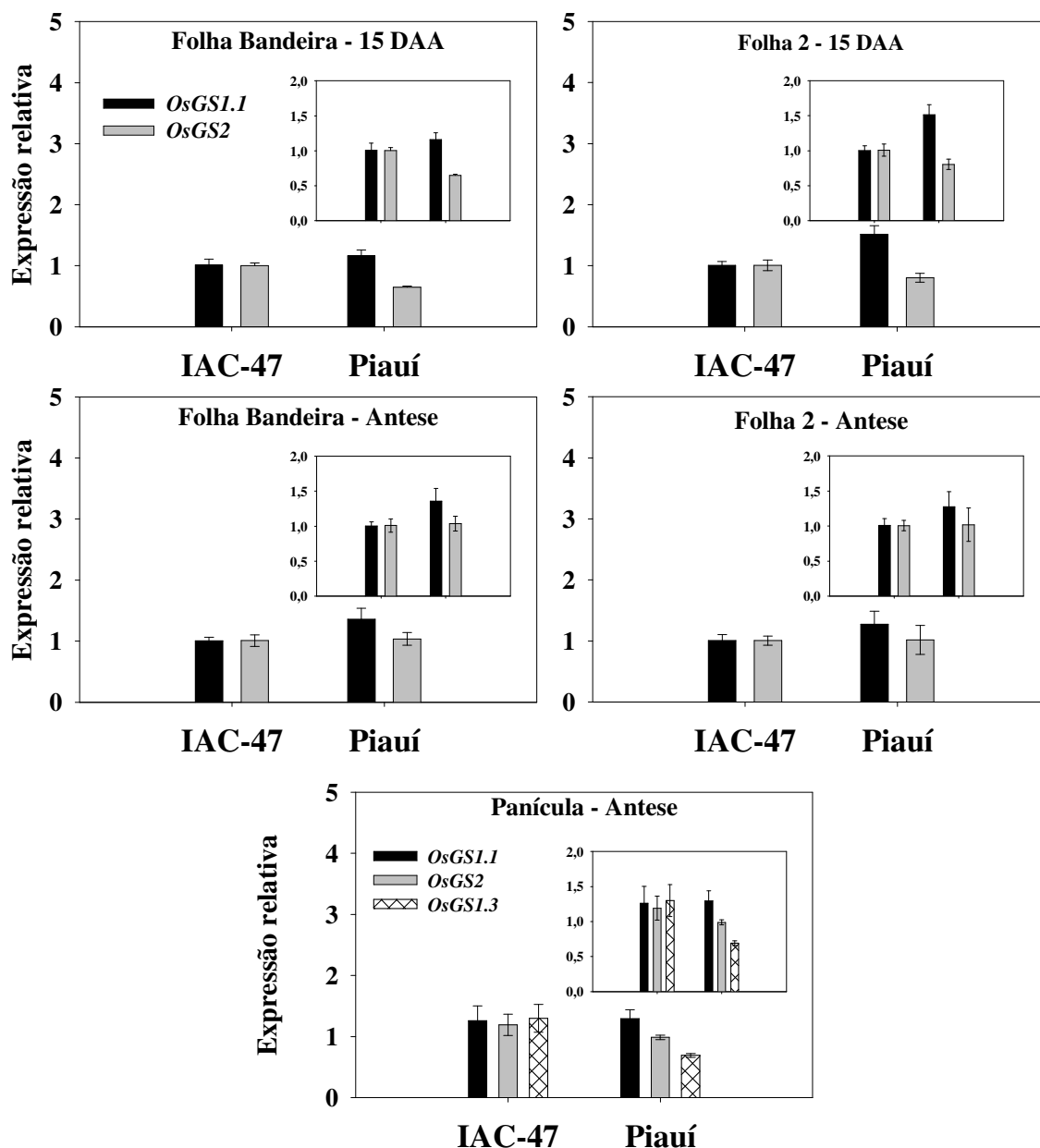


Figura 25. Expressão dos genes *OsGSI.1*, *OsGS2* e *OsGSI.3* aos 15 DAA e no período da antese observada em diferentes partes das plantas da variedade local de arroz do estado do Maranhão Piauí e na variedade melhorada (IAC 47) submetidas a adubação basal com 60 kg/ha de N no plantio.

BRUGIÈRE et al. (2000) verificaram que *GLN1.3* foi especialmente induzido em folhas senescentes de tabaco. TERCE-LAFORGUE (1994) sugeriu o envolvimento dessa isoenzima na reassimilação de amônio liberado durante o processo catabólico. Em trabalhos de MARTIN et al. (2005, 2006) mutantes de milho *gln1;3*, *gln1;4* e um duplo-mutante [*gln1-4/gln1-3*] demonstraram uma acentuada redução de produção de espigas enquanto o percentual de N por espiga aumentou, além disso esses mutantes apresentaram grande acúmulo de $N-NH_4^+$ e aminoácidos nas folhas fonte localizadas abaixo da espiga, como consequência de uma disfunção na exportação de N.

MARTIN et al. (2006) propõem que em células do mesófilo GS1.3 é mais especificamente envolvido na síntese de glutamina após redução de NO_3^- na maturidade da

planta e que o maior impacto da redução da atividade da GS1.3 pode ser uma redução no número de grãos devido a carência de N disponível para induzir a formação de maior quantidade de grãos não abortados. Como esse gene parece estar ligado a atividade de remobilização de N é interessante a maior expressão demonstrada na variedade Piauí quando comprada a IAC-47 no período de enchimento dos grãos.

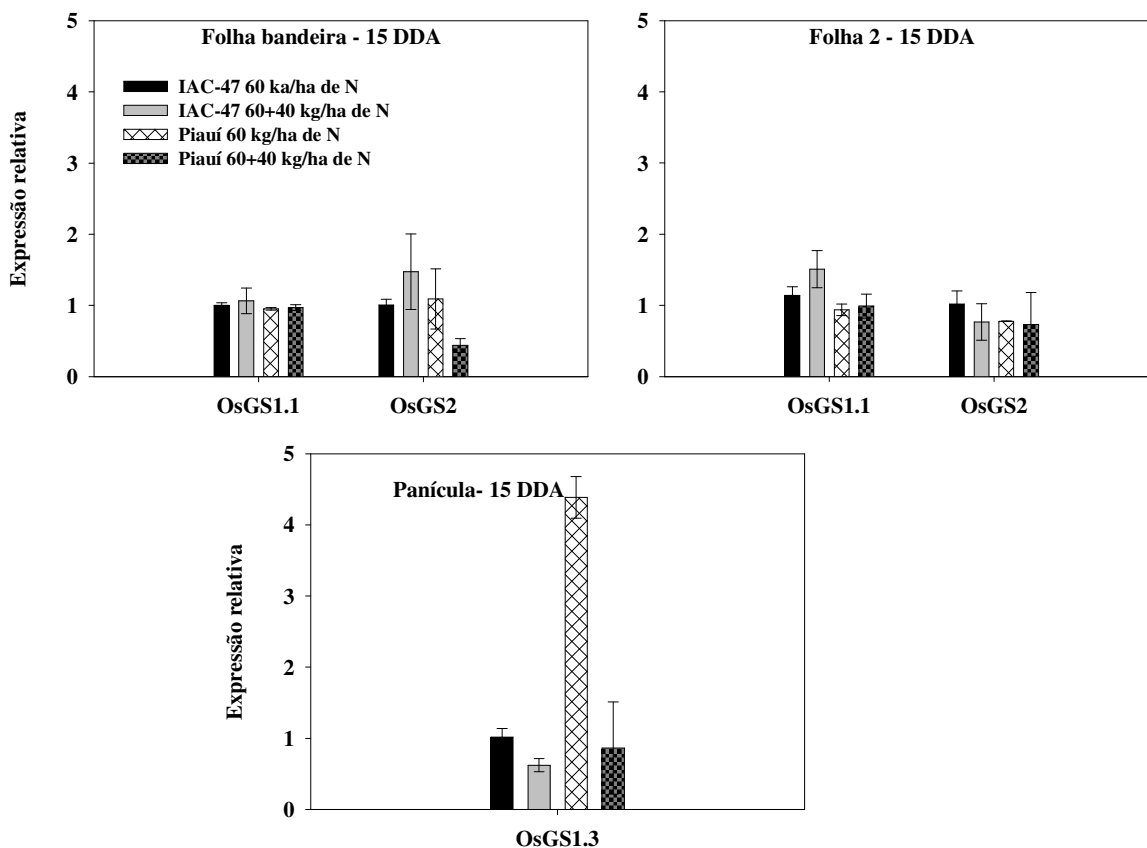


Figura 26. Expressão dos genes *OsGS1.1*, *OsGS2* e *OsGS1.3* aos 15 DDA nas diferentes partes das plantas da variedades local de arroz do estado do Maranhão Píauí e da variedade melhorada IAC-47 submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese

Na coleta aos 15 DDA não foram observadas diferenças de expressão dos genes *OsGS1.1* e *OsGS2* nas folhas bandeira e folhas 2. Porém foram observadas diferenças significativas de expressão com relação ao gene *OsGS1.3*, apresentando-se maior nas plantas da variedade Piauí que não receberam suplementação nitrogenada. A maior expressão do gene *OsGS1.3* aos 15 DAA nas plantas da variedade Piauí, que não receberam suplementação nitrogenada pode estar relacionada a maior capacidades dessas plantas em remobilizar nitrogênio, uma vez que esse gene está associado à atividade de remobilização no período da senescência.

4.6 Remobilização de Nitrogênio

Ao se comparar os conteúdos de N-total na parte aérea das plantas na antese com aqueles obtidos no final do ciclo de desenvolvimento, observa-se maior decréscimo dos teores nas plantas que não receberam suplementação nitrogenada em toda as variedades (Figura 27),

sendo maior o decréscimo nas variedades Piauí, Bico-ganga e Revenda quando comparadas à variedade IAC-47. Estes resultados indicam maior atividade de remobilização de N nas plantas quando não foi ofertado nitrogênio suplementar no período da antese. O que pode ser comprovado pelos maiores valores de remobilização de N para os grãos e eficiência de remobilização de N (Figuras 29 e 30) observada para as plantas das variedades Piauí, Revenda e Bico-ganga que não receberam suplementação nitrogenada.

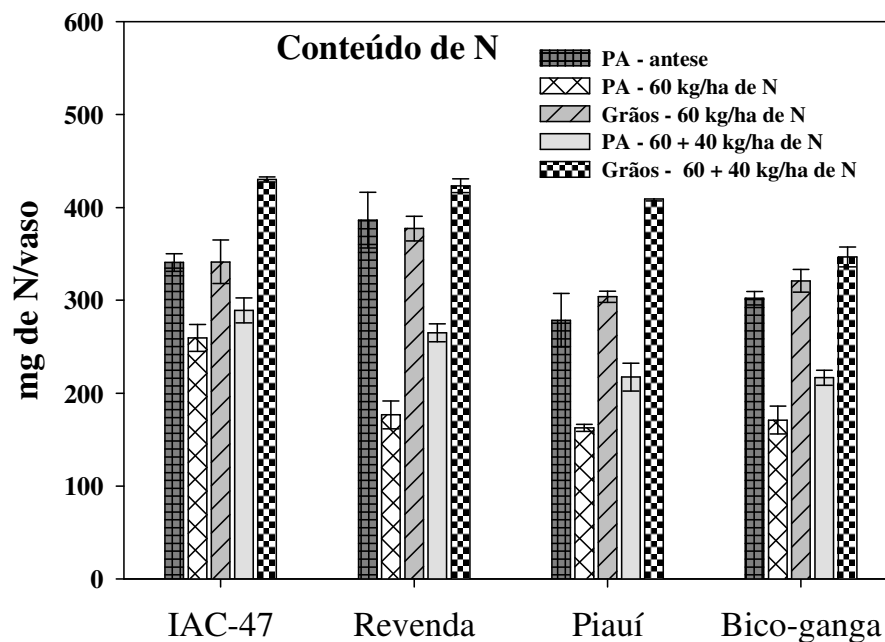


Figura 27. Conteúdo de N-total na parte aérea (PA) e grãos das plantas nas coletas realizadas na antese e ao final do ciclo de desenvolvimento das plantas nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

Foram observados maiores valores de conteúdo de N nos grãos das plantas que receberam suplementação nitrogenada em todas as variedades quando comparadas as plantas sem suplementação. Isto pode ser associado a uma maior absorção de N no período pós antese pelas plantas que receberam tratamento com suplementação (Figura 28), evidenciando a contribuição da suplementação nitrogenada para a produção de grãos com maior teor de proteína. Estes resultados estão de acordo com BOGARD et al (2010), que observou que absorção de N pós-antese tem efeito predominante sobre o desvio de proteínas para os grãos.

BOGRAD et al. (2010) observaram também uma significativa correlação negativa entre remobilização de N e absorção de N no período pós-antese. Isto pode explicar a menor eficiência de remobilização de N observada nas plantas que receberam suplementação nitrogenada em todas as variedades, sendo as maiores diferenças para esse parâmetro encontradas na variedade Piauí.

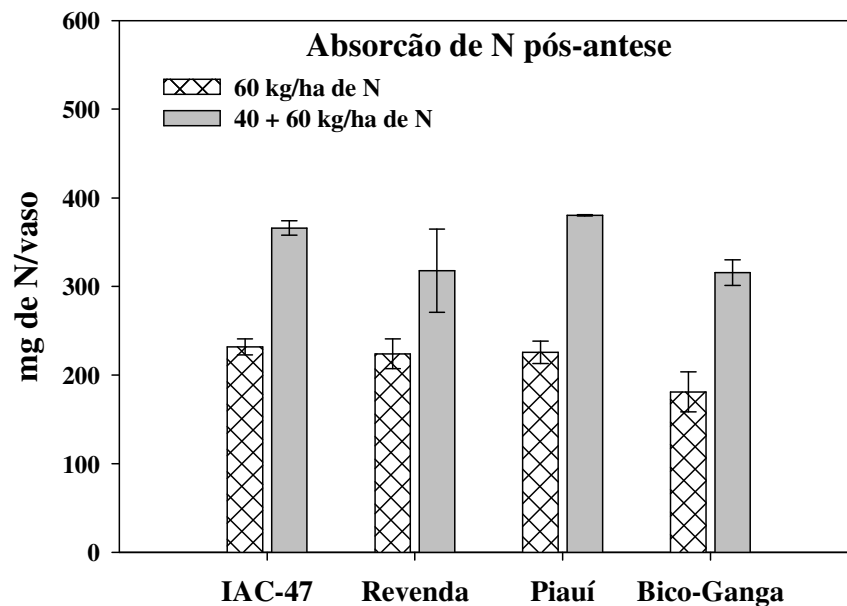


Figura 28. Absorção de N pós-antese (conteúdo de N na parte aérea no final do ciclo de desenvolvimento – conteúdo de N na antese) nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

Não houve grandes diferenças nos valores de remobilização de N para grãos e eficiência de Remobilização de N entre as variedades Piauí, Bico-ganga e Revenda no tratamento sem suplementação nitrogenada, sendo que essas variedades apresentaram valores maiores que a IAC-47 para o mesmo tratamento (Figuras 29 e 30). Não foram observadas grandes diferenças na eficiência de remobilização de N entre as plantas da variedade IAC-47 submetidas aos tratamentos com e sem suplementação nitrogenada (Figura 29). A variedade IAC-47 demonstrou menores valores de remobilização de N para os grãos e eficiência de remobilização de N no tratamento sem suplementação nitrogenada quando comparadas as variedades locais de arroz do estado do Maranhão.

Foram observados menores valores de remobilização de N (Figura 29) para os grãos e eficiência de remobilização de N (Figura 30) para as plantas da variedade Piauí quando submetidas à suplementação nitrogenada. Esses dados evidenciam a maior influência da suplementação sobre a remobilização de N para os grãos nessa variedade.

Os resultados dos parâmetros associados à remobilização de N pelas plantas demonstram maior eficiência das variedades de arroz do estado do Maranhão Piauí, revenda e Bico-ganga em remobilizar o N acumulado nos tecidos no período vegetativo do ciclo de desenvolvimento das plantas quando não é fornecida suplementação nitrogenada. Esses resultados podem refletir uma maior adaptação dessas variedades a condições de fluxo sazonal de N observada no estado do Maranhão, onde as plantas devem absorver o N de forma eficiente assim que disponível no período vegetativo de modo a formar reservas necessárias durante a fase reprodutiva do ciclo para o enchimento dos grãos.

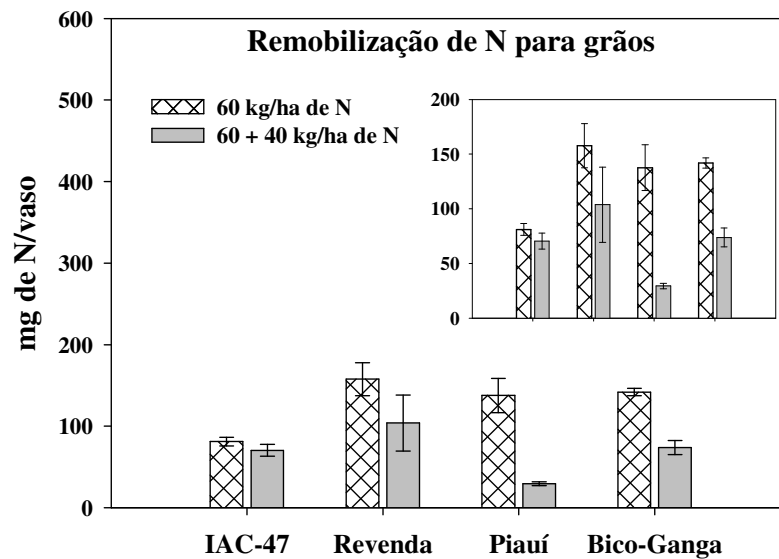


Figura 29. Remobilização de N para grãos (N-total na antese – N total da palha no final do ciclo) ao final do ciclo de desenvolvimento nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

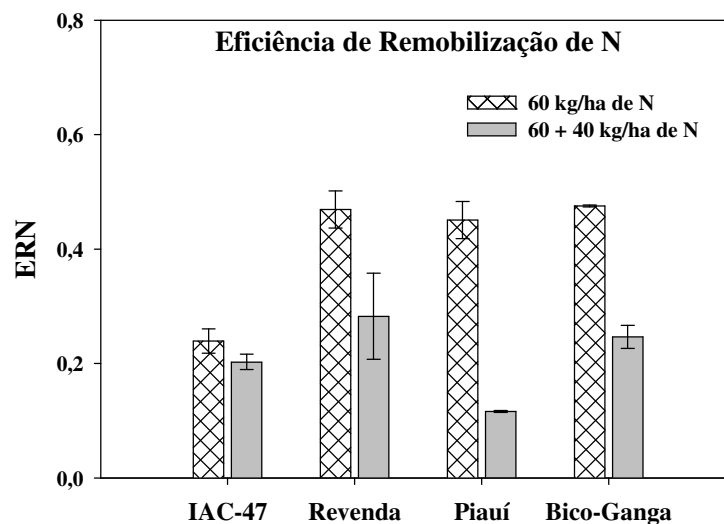


Figura 30. Eficiência de Remobilização de N (remobilização de N para os grãos/N na antese) ao final do ciclo de desenvolvimento nas diferentes partes das plantas das três variedades locais de arroz do estado do Maranhão (Piauí, Bico-Ganga e Revenda) e da variedade melhorada (IAC 47) submetidas a dois tratamentos: *Tratamento 1* (T1) (apenas adubação basal com 60 kg N ha⁻¹ no momento do plantio) e *Tratamento 2* (T2) (adubação basal com 60 kg/ha de N realizada no momento do plantio e adubação suplementar com 40 kg de N ha⁻¹ na antese).

5 CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos demonstram que a variedade de arroz Piauí possui características adaptativas favoráveis ao cultivo em condições limitantes de N, pois apresenta maior capacidade de acúmulo de nitrogênio nos períodos iniciais do ciclo de desenvolvimento e eficiência de remobilização do N acumulado quando não recebe suplementação nitrogenada.
- A variedade de arroz Revenda apesar de ter apresentado comportamento semelhante ao da variedade IAC-47 no período que antecedeu a antese, apresentou características favoráveis a EUN no período reprodutivo do seu ciclo de desenvolvimento, assemelhando-se a variedade Piauí no mesmo período.
- Os maiores valores de expressão do gene *OsGS1.3*, específico de panículas e associado a funções na remobilização de N para os grãos, indicam relação com a maior capacidade de remobilização de N na variedade Piauí
- As variedades locais de arroz do estado do Maranhão: Piauí e Revenda mostraram maior eficiência de remobilização de N quando comparadas a variedade IAC-47 quando submetidas ao tratamento sem suplementação nitrogenada, indicando adaptação dessas variedades às condições de cultivo com baixa disponibilidade de N.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACRECHE, M.M.; SLAFER, G.A. 2009. Variation of grain nitrogen content in relation with grain yield in old and modern Spanish wheats grown under a wide range of agronomic conditions in a mediterranean region. **The Journal of Agricultural Science**, 147(6): 657-667, December 2009.
- ANDREWS, M.; LEA, P. J.; RAVEN, J. A.; LINDSEY, K. Can genetic manipulation of plant nitrogen assimilation enzymes result in increased crop yield and greater N-use efficiency? An assessment. **Analytical Applied Biology**, 154:25-40, 2004.
- ARAÚJO, O.J.L. **Similaridade genética entre variedades de arroz utilizando RAPD e avaliação da cinética de absorção e de expressão de transportadores de nitrato**. 2009. 55f. Dissertação de Mestrado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.
- BARNEIX, A. J. Physiology and biochemistry of source-regulated protein accumulation in the wheat grain. **Journal of Plant Physiology**, 164:581-590, 2007.
- BEATTY, P.H.; YADETA ANBESSA, Y.; JUSKIW, P.; CARROLL, R.T.; WANG, J.; GOOD, A. Nitrogen use efficiencies of spring barley grown under varying nitrogen conditions in the field and growth chamber. **Annals of Botany**, 105: 1171–1182, 2010.
- BERNARD, S.M.; HABASH, D.Z. The importance of cytosolic Glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. **New Phytologist.**, 182: 608–620, 2009.
- BOGARD, M.; ALLARD, V.; BRANCOURT-HULMEL, M.; HEUMEZ, E.; MACHET, J-M.; JEUFFROY, M-H.; GATE, P.; MARTRE, P. and LE GOUIS, J. Deviation from grain protein concentration grain yield negative relationship is highly correlated to post-anthesis N uptake in winter wheat. **Journal of experimental Botany**, 61(15):4303-4312, 2010
- BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 365-372. 2000.
- BRUGIÈRE, N.; DUBOIS, F.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; SANGWAN, R.S.; HIREL, B. Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. **Planta**. 4: 519–527, 2000.
- BUCHER, C. A. **Avaliação através de RT-PCR da expressão dos genes que codificam para enzimas de assimilação de nitrogênio em variedades de arroz**. 2007. 50f. Dissertação de Mestrado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- BUFOGLE JR., A., BOLLIICH, P.K., KOVAR, J.L., MACCHIAVELLI, R.E., LINDAU, C.W., Rice variety differences in dry matter and nitrogen accumulation as related to plant stature and maturity group. **J. Plant Nutr.**, 20:1203–1224, 1997.
- CAI, H.; ZHOU, Y.; XIAO, J.; LI, X.; ZHANG, Q.; LIAN, X. Overexpressed glutamine synthetase gene modifies nitrogen metabolism and abiotic stress responses in Rice. **Plant Cell Rep.**, 28:527–537, 2009.
- CAÑAS, R.A.; QUILLERÉ, I.; CHRIST, A. AND HIREL, B. Nitrogen Metabolism in the developing ear of maize (*Zea mays*): analysis of two lines contrasting in their mode of nitrogen management. **New Phytol.**, 184:340–352, 2009.
- CAÑAS, R.A.; QUILLERÉ, I.; LEA, P.J. AND HIREL, B. Analysis of amino acid metabolism in the ear of maize mutants deficient in two cytosolic glutamine synthetase

isoenzymes highlights the importance of asparagine for nitrogen translocation within sink organs. **Plant Biotechnology Journal**, 8:966–978, 2010.

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**, New York, 6: 853-855, 1975.

CHARDON, F.; BARTHÉLÉMY, J.; D-V, F. AND MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Natural variation of nitrate uptake and nitrogen use efficiency in *Arabidopsis thaliana* cultivated with limiting and ample nitrogen supply. **Journal of Experimental Botany**, 61(9): 2293–2302, 2010.

CHEN, L. & BUSH, D.R. LHT1, a lysine- and histidine-specific amino acid transporter in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** 115: 1127–1134, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sexto levantamento, março 2011. 40 p. Disponível em [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-11\[1\].pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_03_10_09_03_02_boletim_marco-11[1].pdf). Acesso em: 17/03/2011.

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**. 62(4): 1349–1359, 2011.

FARDEN, K.J.S.; ROBERTSON, J.G. Methods for studying enzyme involved in metabolism related to nitrogen . In: BERGSEN FJ ed. **Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation**, Chichester: John Wiley, p.265-314, 1980.

FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. **Analytical Chemistry**, v.49, p.1980, 1977.

FELLER, U.; FISCHER, A. Nitrogen Metabolism in Senescing Leaves. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 13:241-273, 1994.

FERRAZ JÚNIOR, A.S.L. **Estudo do teor de proteína e eficiência de uso de N em cultivares de arroz (*Oryza sativa* L)**. 1993. 209f. Tese de Doutorado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1993.

FISCHER, W.N.; KWART, M.; HUMMEL, S.; FROMMER W.B. Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, 270: 16315–16320, 1995.

FONSECA, J.R.; RANGEL, P.H.; BEDENDO, I.P.; SILVEIRA, P.M.; GUIMARÃES, E.P.; CORANDIN, L. Características botânicas e agrônômicas de cultivares e raças regionais de arroz (*Oryza sativa* L.) coletadas no Estado do Maranhão. Goiânia: **Embrapa-CNPAC-Cernagen**, 1982. 42p. (Boletim de Pesquisa 1).

FONSECA, J.R.; VIEIRA, E.H.N.; PEREIRA, J.A.; CUTRIM, V.A. Descritores Morfoagronômicos e fenológicos de cultivares de arroz coletados no Maranhão. **Revista Ceres**, 51(293):45-56, 2004.

FROMMER, W.B., HUMMEL, S., RIESMEIER, J.W. Expression cloning in yeast of a cDNA encoding a broad specificity amino acid permease from *Arabidopsis thaliana*. **Proc Natl. Acad. Sci. USA**, 90:5944-5948, 1993.

GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of Experimental Botany**, 30: 655:295, 2004.

- GAO, J.W.; LIU, J.Z.; LI, B. AND LI, Z.S. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. **Plant. Mol. Biol. Rep.**, 19:185a-185i, 2001.
- GLASS, A.D.M.; SHAFF, J.E. & KOCHIAN, L.V. Studies of the uptake of nitrate in barley. 4. Electrophysiology. **Plant Physiology**, 99(2):456-463, 1992.
- HABASH, D.Z.; BERNARD, S.; SCHONDELMAIER, J.; WEYEN, J.; QUARRIE, S.A. The genetics of nitrogen use in hexaploid wheat: N utilization, development and yield. **Theoretical and Applied Genetics**, 114: 403–419, 2006.
- HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M. & GALLAIS, A. Towards a Better Understanding of the Genetic and Physiological Basis for Nitrogen Use Efficiency in Maize. **Plant Physiology**, 125:1258-1270, 2001.
- HIRNER A, LADWIG F, STRANSKY H, OKUMOTO S, KEINATH M, HARMS A, FROMMER W. B., KOCH, W. Arabidopsis LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. **Plant Cell**, 18:1931–1946, 2006
- HIRNER, B.; FISCHER, W.N; RENTSCH, D.; KWART, M.; FROMMER, W.B. Developmental control of H⁺/amino acid permease gene expression during seed development of Arabidopsis. **Plant Journal**, 14:535–544, 1998.
- HODGES, M. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. **J. Exp. Bot.**, 53:905–916, 2002.
- IRELAND, R.J. AND LEA, P.J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism. In: SINGH, B.K. (Ed.) **Plant Amino Acids: Biochemistry and Biotechnology**. Marcel Dekker Inc, New York, p. 49–109, 1999.
- ISHIYAMA K, INOUE E, TABUCHI M, YAMAYA T, TAKAHASHI H. Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. **Plant Cell Physiol**, 45:1640–1647, 2004.
- JAIN, M.; TYAGI, A.K.; KHURANA, J. P. Molecular characterization and differential expression of cytokinin-responsive type-A response regulators in rice (*Oryza sativa*). **BMC Plant Bio**, 16:1, 2006.
- JAWORSKI, E.G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical Biophysical Research Communications**, 43(6):1274-1279, 1971.
- JIANG, L.; DAÍ, T.; JIANG, D.; CAO, W.; GAN, X.; WEI, S. Characterizing physiological N-use efficiency as influenced by nitrogen management in three rice cultivars. **Field Crops Research**, 88: 239–250, 2004.
- JIANG, L.G., WANG, W.J., XU, Z.S., 1995. Studies on the developing law of dry matter production and yield of Indica rice varieties. **J. Huazhong Agric. Univ.**, 14:549–554, 1995.
- KANT, S.; BI, Y-M AND ROTHSTEIN, S.J. Understanding plant response to nitrogen limitation for the Improvement of crop nitrogen use efficiency. **Journal of Experimental Botany**. 62(4):1499–1509, 2011.
- KICHEY, T.; HIREL, B.; HEUMEZ, E.; DUBOIS, F.; LE GOUIS, J. In winter wheat (*Triticuma estivum* L.), post-anthesis nitrogen uptake and remobilization to the grain correlates with agronomic traits and nitrogen physiological markers. **Field Crops Research**. 102: 22–32, 2007.

- KWART, M.; HIRNER, B.; HUMMEL, S.; FROMMER, W.B. Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, 4:993–1002, 1993.
- LARSSON, C.M., INGEMARSSON, B. Molecular aspects of nitrate uptake in higher plants. In: WRAY, J.L., KINGHORN, J.R. **Molecular and genetics aspects of nitrate assimilation**. Oxford : Oxford Science, Chapt.1. p: 3-14, 1989.
- LEA, P.J.; MIFLIN, B.J. An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. **Nature**, 251: 614-616, 1974.
- LIU, X. AND BUSH, D.R. Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. **Amino Acids**., 30:113–120, 2006.
- LOTHIER, J.; GAUFICHON, L.; SORMANI, R.; LEMAÎTRE, T.; AZZOPARDI, M.; MORIN, H.; CHARDON, F.; REISDORF-CREN, M.; AVICE, J-C. AND MASCLAUX-DAUBRESSE, C. The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. **Journal of Experimental Botany**, 62(4): 1375–1390, 2011.
- LUBKOWITZ, M. The OPT family functions in long-distance peptide and metal transport in plants. **Genet. Eng.** 27: 35–55, 2006.
- MARTIN, A.; BELASTEGUI-MACADAM, X.; QUILLERÉ, I.; FLORIOT, M.; VALADIER, M.H.; POMMEL, B.; ANDRIEU, B.; DONNISON, I.; AND HIREL, B. Nitrogen management and senescence in two maize hybrids differing in the persistence of leaf greenness. Agronomic, physiological and molecular aspects. **New Phytol.** 167: 483–492, 2005.
- MARTIN, A.; LEE, J.; KICHEY, T.; GERENTES, D.; ZIVY, M.; TATOUT, Z.; DUBOIS, F.; BALLIAU, T.; VALOT, B.; DAVANTURE, M.; TERCÉ-LAFORGUE, T.; QUILLERÉ, I.; COQUE, M.; GALLAIS, C.; GONZALEZ-MORO, M-B.; BETHENCOURT, L.; HABASH, D. Z.; LEA, P.J.; CHARCOSSET, A.; PEREZ, P.; MURIGNEUX, A.; SAKAKIBARA, H.; EDWARDS, K.J. AND HIREL, B. Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. **The Plant Cell** 18:3252–3274, 2006.
- 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. **Ann. Bot.**, 105(7):1141-1157, 2010.
- MASCLAUX-DAUBRESSE, C.; REISDORF-CREN, M. & ORSEL, M. Leaf Nitrogen Remobilization for plant development and grain filling. **Plant Biology**, 10:23-36, 2008.
- MAXCLAUX, C.; QUILLERE, I.; GALLAIS, A. AND HIREL, B. The challenge of remobilisation in plant nitrogen economy. A survey of physioagronomic and molecular approaches. **Ann. Appl. Biol.** 138:69-81, 2001.
- McINTYRE, G.I. The role of nitrate in the osmotic and nutritional control of plant development. **Aust J Plant Physiol.**, 24:103–118, 1997.
- MICKELSON, S.; SEE, D.; MEYER, F.D.; GARNER, J.P.; FOSTER, C.R., BLAKE, T.K., AND FISCHER, A.M. Mapping of QTL associated with Nitrogen storage and remobilization in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **J. Exp. Bot.** 54:801–812, 2003.
- MILLER, A.J.; SMITH, S.J. Cytosolic nitrate ion homeostasis, could it have a role in sensing nitrogen status? **Annals of Botany**. 101:485–489, 2008.

- MUNIER-JOLAIN, N.G. & SALON, C. Are the carbon costs of seed production related to the quantitative and qualitative performance? An appraisal for legume and other crops. **Plant Cell Environ.**, 28:1388-1395, 2005.
- OKUMOTO, S.; SCHMIDT, R.; TEGEDER, M.; FISCHER, W. N.; RENTSCH, D.; FROMMER, W. B. AND KOCH, WOLFGANG. High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of *Arabidopsis*. **J. Biol. Chem.**, 277: 45338–45346, 2002.
- PALTA, J.A.; FILLERY, I.R.P. N application increases pre-anthesis contribution of dry matter to grain yield in wheat grown on a duplex soil. **Australian Journal of Agricultural Research**, 46:507–518, 1995.
- PATHAK, R.R.; AHMAD, A.; LOCHAB, S.; RAGHURAM, N. Molecular physiology of plant nitrogen use efficiency and biotechnological options for its enhancement. **Current Science**, 94:1394–1403, 2009.
- PEETERS, K. M. U. & LAERE, A. J. V. Amino acid metabolism associated with N-mobilization from the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.) during grain development. **Plant Cell Environ.** 17: 131-141, 1994.
- RENTSCH, D., SCHMIDT, S. AND TEGEDER, M. Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. **FEBS Lett.** 581:2281–2289, 2007.
- RODRIGUES, F. de S.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Nitrogen metabolism in rice cultivated under seasonal flush of nitrate. **Journal of Plant Nutrition**, 27(3):395-409, 2004.
- RODRIGUES, L. R. F. & ANDO, A. Caracterização e avaliação de três grupos de arroz-de-sequeiro de diferentes procedências por meio da sensibilidade à radiação gama. **Bragantia**, 61(1): 17-23, 2002.
- ROLLETSCHEK, H.; HOSEIN, F.; MIRANDA, M.; HEIM, U.; GÖTZ, K-P, SCHLERETH, A.; BORISJUK, L.; SAALBACH, I.; WOBUS, U. AND WEBER, H. Ectopic Expression of an Amino Acid Transporter (VfAAP1) in Seeds of *Vicia narbonensis* and Pea Increases Storage Proteins. **Plant Physiology**, 137:1236–1249, 2005.
- SABINO, D.C.C. **Estudos ecológicos e moleculares da interação planta-bactéria diazotrófica na cultura de arroz.** 2007. 54f. Tese de Doutorado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007.
- SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; SOUZA, S. R.; FERNANDES, M. S. Effects of nitrogen stress on proton-pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition**, 32: 549 – 564, 2009.
- SCHEIBLE, W.R.; GONZÁLES-FONTES, A.; LAUERER, M.; MÜLLER-RÖBER, B.; CANOCHE, M.; AND STITT, M. Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in Tobacco. **The Plant Cell**, v.9, p.783-798, 1997.
- SEEBAUER, J. R.; MOOSE, S.P.; FABBRI, B. J.; CROSSLAND, L.D.; BELOW, F.E. Amino acid metabolism in maize ear shoots. Implications for assimilate preconditioning and nitrogen signaling. **Plant, Physiol.**, 136: 4326–4334, 2004.
- SHIYAMA, K.; INOUE, E.; WATANABE-TAKAHASHI, A.; OBARA, M.; YAMAYA, T.; TAKAHASHI, H. Kinetic properties and ammonium-dependent regulation of cytosolic isoenzymes of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, 279:16598–16605, 2004.

- SOUZA, S. R. **Efeito da aplicação foliar de nitrogênio pós-antese sobre as enzimas de assimilação de N e acúmulo de proteína em grãos de arroz.** 1995. 178f. Tese de Doutorado. (Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) - Instituto de Agronomia. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1995.
- SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M. & FERNANDES, M. S. Nitrogen remobilization during the reproductive period in two Brazilian rice varieties. **Journal of Plant Nutrition**, New York, 21(10): 2049-2063, 1998.
- SOUZA, S. R.; STARK, E.M.L.M.; FERNANDES, M.S. & MAGALHÃES, J.R. Effects of supplemental nitrogen on nitrogen- assimilation enzymes, free amino nitrogen, soluble sugars and crude protein of rice. **Communication in Soil. Science and. Plant Analysis** ., 30(56): 711- 724, 1999.
- SPEROTTO, R.A.; RICACHENEVSKY, F.K.; DUARTE. G. L.; BOFF, T.; LOPES, K.L. SPERB, E.R.; GRUSAK. M.A.; FETT, J.P. Identification of up-regulated genes in Xag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. **Planta**, 230:985–1002, 2009.
- SWARBRECK, S.M.; DEFOIN-PLATEL, M.; HINDLE, .; SAQI, M.; HABASH, D.Z. New perspectives on glutamine synthetase in grasses. **Journal of Experimental Botany**. 62(4): 1511–1522, 2011.
- TABUCHI M, SUGIYAMA K, ISHIYAMA K, INOUE E, SATO T, TAKAHASHI H, YAMAYA, T. Severe reduction in growth rate and grain filling of rice mutants lacking OsGS1;1, a cytosolic glutamine synthetase1;1. **Plant Journal**, 42:641–651, 2005.
- TABUCHI, M.; ABIKO,T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in Rice (*Oryza sativa L.*). **Journal of Experimental Botany**. 58: 2319–2327, 2007.
- TEDESCO, J. M.; GIANELLO, C.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análise de solos, plantas e outros materiais. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 174p
- TEGEDER, M. & ANDWEBER, A.P.M. Metabolite transporters in the control of plant primary metabolism. In: PLAXTON, W. & MCMANUS, M., (Eds.). Annual Plant Reviews: Control of primary metabolism in plants, 22: 85–120, Blackwell Publishing, Oxford, 2006.
- TERCE-LAFORGUE, T.; MACK, G.; HIREL, B. New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. **Physiol. Plant**. 120: 220–228, 1994.
- UAUY, C.; DISTELFELD, A.; FAHIMA, T.; BLECHIL, A.; DUBCOVSKY, J. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc and iron content in wheat. **Science**, 314:1298-1301, 2006.
- WALLSGROVE, R.M.; TURNER, J.C.; HALL, N.P.; KENDALL, A.C.; BRIGHT, S.W.J. Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase-biochemical and genetic analysis. **Plant Physiol.**, 83:155–158, 1987.
- WATERWORTH, W.M.; BRAY, C.M. Enigma variations for peptides and their transporters in higher plants. **Ann. Bot**. 98: 1–8, 2006.
- WILLIAMS, L.E. & MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.**, 52:659-688, 2001.

WOODALL, J.; FORDE, B.G. Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. **Plant, Cell & Environment**, 19:848–858, 1996.

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.

ZOZAYA-HINCHLIFFE, M.; POTENZA, C.; ORTEGA, J.L.; SENGUPTA-GOPALAN, C. Nitrogen and metabolic regulation of the expression of plastidic glutamine synthetase in alfalfa (*Medicago sativa*). **Plant Science**, 168: 1041–1052, 2005.