

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**NITRATO NO SUPRIMENTO DE NITROGÊNIO  
PARA O ARROZ CULTIVADO SOB  
ALAGAMENTO**

**Marquel Jonas Holzschuh**

**(Tese)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**NITRATO NO SUPRIMENTO DE NITROGÊNIO  
PARA O ARROZ CULTIVADO SOB  
ALAGAMENTO**

MARQUEL JONAS HOLZSCHUH

Engenheiro Agrônomo (UFSM)  
Mestre em Ciência do Solo (UFSM)

Tese apresentada como  
um dos requisitos à obtenção do  
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre, (RS), Brasil

Fevereiro de 2011

MARQUEL JONAS HOLZSCHUH  
Engenheiro Agrônomo (UFSM)  
Mestre em Ciência do Solo (UFSM)

**TESE**

Submetida como parte dos requisitos

para obtenção do Grau de

**DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

FACULDADE DE AGRONOMIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:  
Pela Banca Examinadora

Homologado em:  
por

IBANOR ANGHINONI  
Professor Orientador

FLÁVIO A. de OLIVEIRA CAMARGO  
Coordenador do PPG em Ciência  
do Solo

MARINO JOSÉ TEDESCO  
PPG – Ciência do Solo/UFRGS

ROGÉRIO OLIVEIRA DE SOUSA  
PPG – Ciência do Solo/UFPEL

PEDRO SELBACH  
Diretor da Faculdade de Agronomia

PAULO RÉGIS FERREIRA DA SILVA  
Departamento de Fitotecnia/UFRGS

DEDICO a meus pais: Alvarindo Holzschuh e  
Norma Anida Ehrhardt Holzschuh

A Cláudia Bernardes Ourique,  
Pessoas às quais devo tudo, em especial pela compreensão,  
apoio, incentivo constante e principalmente por me  
proporcionarem o que um ser humano precisa para ser feliz.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao PPG em Ciência do Solo e ao Departamento de Solos, que auxiliaram e possibilitaram a realização do trabalho.

Ao Professor Ibanor Anghinoni, pelo desafio da orientação, estímulo ao espírito de pesquisa, exemplo de dedicação e honestidade e, acima de tudo, amizade.

Ao Professor Humberto Bohnen, pelo auxílio na orientação nos momentos decisivos na elaboração e andamento do trabalho, exemplo de honestidade, humanismo, amizade e, acima de tudo, dedicação, seriedade e comprometimento exemplar com a ciência.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelos ensinamentos e pela oportunidade de convívio com profissionais dedicados ao desenvolvimento da ciência do solo e na formação de profissionais e pessoas.

A CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao IRGA, pelo importante auxílio prestado e na cedência de recursos físicos e financeiros para a execução do projeto de pesquisa.

Ao Professor do Departamento de Fitopatologia Marcelo Gravina de Moraes, pelo importante auxílio prestado e na cedência de laboratório, equipamentos e materiais.

A Professora do Departamento de Química Tânia Mara Pizolatto, pelo importante auxílio prestado e na cedência de laboratório, equipamentos e materiais.

Aos colegas do PPG em Ciência do Solo, em especial a Sérgio Costa, Osmar Conte, Clamarion Maier, Felipe Carmona, Letícia Sequinato, Daniela Barbosa, Jonatan Müller, Sidinei Stürmer, Tiago Zschornack, Joice Assmann, Michael Mazurana, Cecília Sacramento, pelas valiosas horas de convívio e boas recordações dos momentos de lazer e alegria, entre tantos outros, que fizeram parte da minha passagem pelo curso e certamente ficarão para sempre na minha memória.

Agradeço de maneira especial, aos bolsistas de iniciação científica Filipe Selau Carlos, Diego Cecagno, Álvaro Costa, que realizaram o trabalho de forma brilhante e com qualidade.

Aos funcionários Adão Luis, Luis Antônio (Tonho), Paulo Ricardo Teixeira da Luz, José Ferreira (Zé), Jader Ribeiro pelo importante auxílio prestado, pela competência na realização de seu trabalho e pelos momentos de descontração e alegria.

A todos, meu muito obrigado!

# NITRATO NO SUPRIMENTO DE NITROGÊNIO PARA O ARROZ CULTIVADO SOB ALAGAMENTO <sup>(1)</sup>

Autor: Marquel Jonas Holzschuh

Orientador: Prof. Ibanor Anghinoni

## RESUMO

Em solos alagados, o amônio é a forma nitrogenada mais estável, ao contrário do nitrato, que é rapidamente perdido por desnitrificação. Por isso, pouca importância é dada ao nitrato como fonte de N para o arroz em solos alagados. Entretanto, a nitrificação na rizosfera e na superfície do solo pode fornecer nitrato para o arroz. Este trabalho, constituído por três estudos, cada um com dois experimentos, foi realizado para avaliar a importância dessas duas formas na absorção de nitrogênio e no desenvolvimento de genótipos de arroz. No Estudo 1, avaliou-se o efeito de proporções de amônio e nitrato, em solução nutritiva, na morfologia do sistema radicular, na absorção de nitrogênio e no desenvolvimento de genótipos de arroz. No Estudo 2, avaliou-se uma metodologia para avaliar a formação de aerênquima, liberação de oxigênio na raiz e sua relação com a oxidação de ferro. No Estudo 3, avaliou-se a relação entre a disponibilidade de nitrato em solo e solução nutritiva, e a expressão gênica de *OsNRTs*. O efeito combinado de amônio e nitrato promoveu melhor crescimento do arroz em relação às fontes isoladas e indica que o nitrato é fonte importante de nitrogênio para essa cultura. As fontes isoladas podem causar toxidez às plantas. A metodologia testada para obter ambiente de hipoxia foi eficiente por retirar o oxigênio livre, e estabelece uma relação entre a porosidade da raiz e a formação de placa férrica, possibilitando diferenciar genótipos quanto à capacidade de liberar oxigênio para a rizosfera. A detecção de nitrato no solo alagado e na seiva do xilema, aliados à expressão dos genes *OsNRTs*, de forma diferenciada entre genótipos de arroz, demonstram que o nitrato é uma fonte importante de suprimento de nitrogênio e para o arroz irrigado por inundação.

Palavras-chave: Solos alagados, *Oryza sativa* L., Aerênquima, *OsNRT*, expressão gênica, nitrificação.

---

<sup>(1)</sup> Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil. (136 p.) – Fevereiro, 2011. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES e do Instituto Rio Grandense do Arroz.

# NITRATE TO NITROGEN SUPPLY TO FLOODED RICE <sup>(1)</sup>

Author: Marquel Jonas Holzschuh

Adviser: Prof. Ibanor Anghinoni

## ABSTRACT

In flooded soils, ammonium is the stable nitrogen form, while nitrate is lost by denitrification. As result, little importance is given to nitrate as nitrogen source for rice in flooded soils. However, nitrification processes in rhizosphere zone and at soil surface can furnish nitrogen as nitrate for flooded rice. This research was conducted, as three studies, each one by two experiments, to evaluate the importance of each, ammonium and nitrate forms, for nitrogen nutrition and development of rice genotypes. In Study 1, the effect of different proportions of such nitrogen forms, in nutrient solution, on root morphology, nitrogen uptake and rice development were evaluated. In Study 2, a methodology to verify aerenchyma formation, oxygen release and iron plaque formation at root surface was tested. In Study 3, the relation among nitrate availability, in soil and nutrient solution, and *OsNRTs* gene expression was evaluated. The effect of combined, ammonium and nitrate forms provide better rice growth than each single nitrogen form, and indicate that nitrate is an important nitrogen source to rice. Ammonium and nitrate alone are toxic for rice plants. The proposed methodology to obtain hypoxia environment was efficient to extract free oxygen, and made possible to obtain a relationship of root porosity with iron plaque formation, and to differentiate rice genotypes as the capacity to release oxygen to rhizosphere. The presence of nitrate in flooded soil and in xylem sap, together with *OsNRTs* gene expression, that is different among rice genotypes, indicate that nitrate is an important nitrogen supply form for flooded rice.

Key words: Flooded soil, *Oryza sativa* L., aerenchyma, *OsNRT*, gene expression, nitrification.

---

<sup>(1)</sup> Doctoral Thesis in Soil Science. Programa de Pós Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brazil. (136 p.) – February, 2011. Research supported by CAPES and Instituto Rio Grandense do Arroz.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	01
2. CAPÍTULO I – Estado atual do conhecimento .....	05
2.1. O cultivo de arroz irrigado .....	05
2.2. Solos alagados e a disponibilidade de nitrogênio .....	08
2.3. Absorção e assimilação de nitrogênio .....	15
2.3.1. A absorção e assimilação de $\text{NH}_4^+$ .....	16
2.3.2. A absorção e assimilação de $\text{NO}_3^-$ .....	18
2.4. Morfologia do sistema radicular do arroz .....	21
2.4.1. Tipo de raízes e distribuição no solo .....	21
2.4.2. Formação de aerênquima e suprimento de $\text{O}_2$ no arroz .....	23
2.4.3. Perda radial de oxigênio nas raízes e oxidação do ferro .....	25
3. CAPÍTULO II – Estudo 1: <b>Resposta do arroz cultivado em solução nutritiva a diferentes fontes de nitrogênio</b> .....	27
3.1. Experimento 1 - Resposta do arroz irrigado ao suprimento combinado de amônio e nitrato .....	27
3.1.1. Introdução .....	27
3.1.2. Hipóteses .....	28
3.1.3. Objetivos .....	29
3.1.4. Material e métodos .....	29
3.1.5. Análise estatística .....	31
3.1.6. Resultados e discussão .....	31
3.1.6.1. <i>Produção de biomassa e efeito dos íons <math>\text{NH}_4^+</math> e <math>\text{NO}_3^-</math> no desenvolvimento das plantas</i> .....	31
3.1.6.2. <i>Distribuição e comprimento de raízes</i> .....	35
3.1.6.3. <i>Nutrientes na biomassa</i> .....	37
3.1.7. Conclusões .....	39
3.2. Experimento 2 -Suprimento combinado de amônio e nitrato no desenvolvimento e absorção de nutrientes pelo arroz .....	40
3.2.1. Introdução .....	40
3.2.2. Hipótese .....	42
3.2.3. Objetivos .....	42
3.2.4. Material e métodos .....	42
3.2.5. Análise estatística .....	45
3.2.6. Resultados e discussão .....	45
3.2.6.1. <i>Produção de biomassa</i> .....	45
3.2.6.2. <i>Nutrientes na biomassa</i> .....	50
3.2.6.3. <i>Nutrientes na seiva do xilema</i> .....	51
3.2.7. Conclusões .....	54



4. CAPÍTULO III – Estudo 2: <b>Formação de aerênquima e sua relação com a liberação de oxigênio e oxidação do ferro em raízes de arroz</b> .....	55
4.1. Experimento 1 - Avaliação da porosidade e placa férrica de raízes adventícias de arroz cultivado em hipoxia .....	55
4.1.1. Introdução .....	55
4.1.2. Hipóteses .....	56
4.1.3. Objetivo .....	56
4.1.4. Material e métodos .....	57
4.1.4.1. <i>Obtenção de raízes de arroz em ambiente de hipoxia</i> .....	57
4.1.4.2. <i>Placa férrica e porosidade</i> .....	60
4.1.4.3. <i>Determinação da porosidade de raízes</i> .....	61
4.1.4.4. <i>Teste da metodologia</i> .....	62
4.1.5. Análise estatística .....	63
4.1.6. Resultados e discussão .....	63
4.1.7. Conclusão .....	67
4.2. Experimento 2 - Oxidação do ferro na superfície de raízes adventícias e sua relação com a formação de aerênquima em genótipos de arroz .....	68
4.2.1. Introdução .....	68
4.2.2. Hipóteses .....	69
4.2.3. Objetivo .....	69
4.2.4. Material e métodos .....	69
4.2.5. Análise estatística .....	70
4.2.6. Resultados e discussão .....	70
4.2.7. Conclusões .....	78
5. CAPÍTULO IV – Estudo 3: <b>Expressão gênica de OsNRTs em genótipos de arroz</b> .....	79
5.1. Experimento 1 - Disponibilidade de nitrato em solo alagado e sua influência sobre a expressão gênica de OsNRT1.1 e OsNRT2.1 e na absorção de nitrogênio em genótipos de arroz .....	79
5.1.1. Introdução .....	79
5.1.2. Hipóteses .....	80
5.1.3. Objetivos .....	80
5.1.4. Material e métodos .....	81
5.1.5. Resultados e discussão .....	90
5.1.5.1. <i>Produção de biomassa</i> .....	90
5.1.5.2. <i>Amônio e nitrato na solução do solo</i> .....	91
5.1.5.3. <i>Nutrientes na seiva do xilema</i> .....	94
5.1.5.4. <i>Expressão gênica de OsNRTs</i> .....	98
5.1.5.5. <i>Conclusões</i> .....	105

5.2. Experimento 2: Expressão dos genes <i>OsNRT2.1</i> e <i>OsNRT1.1</i> em genótipos de arroz cultivados em solução nutritiva .....	107
5.2.1. Introdução .....	107
5.2.2. Hipótese .....	108
5.2.3. Objetivo .....	108
5.2.4. Material e métodos .....	109
5.2.5. Resultados e discussão .....	111
5.2.6. Conclusões .....	114
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>115</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>117</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>121</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> Concentração de nutrientes da solução nutritiva que compõe as proporções de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva .....	30
<b>Tabela 2</b> Biomassa da parte aérea, raízes e relação raiz/parte área de cultivares de arroz em função de proporções de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva .....	32
<b>Tabela 3</b> Distribuição do sistema radicular de cultivares de arroz em função do suprimento combinado de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva .....	36
<b>Tabela 4</b> Nutrientes na biomassa de cultivares de arroz em função do suprimento combinado de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva .....	38
<b>Tabela 5</b> Concentração da solução nutritiva que compõe as proporções de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ .....	43
<b>Tabela 6</b> Biomassa da parte aérea, raízes, total e relação raiz/parte área de arroz em função de proporções de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva .....	46
<b>Tabela 7</b> Nutrientes na biomassa de arroz em função do suprimento combinado de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva .....	51
<b>Tabela 8</b> Nutrientes na seiva do xilema de arroz em função do suprimento combinado de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ na solução nutritiva .....	53
<b>Tabela 9</b> Atributos químicos do Planossolo Háplico antes da instalação dos experimentos .....	82
<b>Tabela 10</b> Nutrientes na seiva do xilema de genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com aplicação de uréia .....	94
<b>Tabela 11</b> Composição das soluções nutritivas utilizadas para induzir a expressão dos genes <i>OsNRT1.1</i> , <i>OsNRT2.1</i> e Actina em genótipos de arroz .....	109

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> Desenvolvimento do sistema radicular do arroz submetido ao suprimento combinado de $\text{NH}_4^+$ e $\text{NO}_3^-$ em solução nutritiva .....	49
<b>Figura 2</b> Unidade experimental preenchida com um Gleissolo Háplico, contendo os sacos de vinil e as respectivas plantas de arroz com raízes removidas .....	58
<b>Figura 3</b> Plantas de diferentes genótipos de arroz com raízes removidas e preparadas para produção de raízes adventícias em hipoxia .....	59
<b>Figura 4</b> Detalhes da formação de raízes adventícias obtidas em sacos de vinil e em solo alagado sob hipoxia .....	59
<b>Figura 5</b> Detalhes da caixa de vidro contendo segmentos de raízes imersos em solução do solo com pH = 6,2 e com $80 \text{ mg L}^{-1}$ de ferro utilizadas para formação da placa férrica .....	61
<b>Figura 6</b> Detalhes das seringas utilizadas para avaliar o espaço poroso de raízes adventícias de arroz irrigado .....	62
<b>Figura 7</b> Porosidade de raízes adventícias dos genótipos de arroz IRGA 423 (A) e IRGA 424 (B), em função do tratamento das raízes: com e sem oxigenação (hipoxia) em três segmentos. Letras minúsculas comparam as regiões da raiz e letras maiúsculas comparam condições de oxigenação pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	65
<b>Figura 8</b> Teores de ferro na superfície das raízes adventícias dos genótipos de arroz IRGA 423 (A) e IRGA 424 (B), em função do tratamento das raízes: com e sem oxigenação (hipoxia) em três segmentos. Letras minúsculas comparam as regiões da raiz e letras maiúsculas comparam condições de oxigenação pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	66
<b>Figura 9</b> Relação entre porosidade e quantidade de ferro em segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz	

	(IRGA 423 e IRGA 424), mantidos em ambiente com aeração e hipoxia .....	67
<b>Figura 10</b>	Porosidade em três segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz obtidas em hipoxia. Letras minúsculas comparam genótipos para cada segmento e as letras maiúsculas comparam segmentos dentro de cada genótipo pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	71
<b>Figura 11</b>	Distribuição do ferro em três segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz obtidas em hipoxia, após a exposição a uma solução de um Gleissolo Háplico com pH = 6,0 e 80 mg L <sup>-1</sup> de ferro. Letras minúsculas comparam genótipos para cada segmento e as letras maiúsculas comparam segmentos dentro de cada genótipo pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	72
<b>Figura 12</b>	Porosidade média relativa em três segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz produzidos em condições de hipoxia. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	74
<b>Figura 13</b>	Ferro total (soma dos três segmentos) na superfície de raízes adventícias de genótipos de arroz após a exposição a uma solução de um Gleissolo Háplico com pH = 6,0 e 80 mg L <sup>-1</sup> de ferro. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	74
<b>Figura 14</b>	Correlação entre a porosidade e o ferro total em segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz (A e B) obtidas em hipoxia, após quatro horas de exposição à solução de um Gleissolo Háplico com pH = 6,0 e 80 mg L <sup>-1</sup> de ferro .....	76
<b>Figura 15</b>	Detalhes das unidades experimentais utilizadas para o cultivo dos genótipos de arroz em solo alagado em casa de vegetação .....	82
<b>Figura 16</b>	Detalhes do mecanismo utilizado para a coleta de solução do solo (a) e ilustração da coleta (b) .....	84
<b>Figura 17</b>	Produção de biomassa da parte aérea, raízes e total de genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento (42 dias) com aplicação de uréia. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	91
<b>Figura 18</b>	Teores de N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> na solução do solo (Planossolo Háplico), em duas profundidades, 24 horas após a terceira aplicação de uréia para diferentes genótipos de arroz cultivado sob alagamento. Letras minúsculas comparam genótipos e letras maiúsculas comparam	

	profundidades pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	92
<b>Figura 19</b>	Teores de $N-NO_3^-$ na solução do solo (Planossolo Háplico), em duas profundidades, 24 horas após a terceira aplicação de uréia para diferentes genótipos de arroz cultivado sob alagamento. Letras minúsculas comparam genótipos e letras maiúsculas comparam profundidades pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	93
<b>Figura 20</b>	Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação do mRNA do <i>OsNRT2.1</i> por RT- <i>q</i> PCR em genótipos de arroz irrigado cultivados em solo sob alagamento com a aplicação de uréia. Os números 1, 2 e 3 referem-se as repetições de cada genótipo e M, ao marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen) .....	99
<b>Figura 21</b>	Acúmulo de mRNA do gene <i>OsNRT1.1</i> em raízes de genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com aplicação de uréia. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ) .....	100
<b>Figura 22</b>	Correlação entre acúmulo de mRNA do gene <i>OsNRT1.1</i> e teores de nitrato na seiva do xilema de diferentes genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com a aplicação de uréia .....	102
<b>Figura 23</b>	Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação do mRNA de <i>OsNRT1.1</i> (A), <i>OsNRT2.1</i> (B) e Actina (controle endógeno) (C) em genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com a aplicação de uréia. 1- IRGA 417, 2- EPAGRI 108, 3- IRGA 3073, 4 - IRGA 424, 5 - BR-IRGA 409, 6 - Formosa, 7 - IRGA 423, 8 - Bluebelle, 9 - Azire QM 1010; 10 - Orizica e M - marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen) .....	103
<b>Figura 24</b>	Acúmulo de mRNA do gene <i>OsNRT1.1</i> em raízes de genótipos de arroz cultivados em solução nutritiva .....	112
<b>Figura 25</b>	Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação do mRNA dos genes <i>OsNRT2.1</i> (A), <i>OsNRT1.1</i> (B) e Actina (controle endógeno) (C) em diferentes genótipos de arroz cultivado em solução nutritiva. Tratamentos de indução: (1) $NH_4^+$ 0:0 $NO_3^-$ , (2) $NH_4^+$ 50:50 $NO_3^-$ e (3) $NH_4^+$ 0:100 $NO_3^-$ e (M) marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen) .....	113

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

No Estado do Rio Grande do Sul, cerca de 20% da área é constituída por solos de várzea, localizados principalmente na metade sul do Estado, em uma área de aproximadamente 5,4 milhões de hectares (Pinto et al., 1999). O relevo, predominantemente plano a suavemente ondulado, aliado à drenagem deficiente, favorece o cultivo de arroz irrigado por alagamento, ocupando atualmente uma área em torno de um milhão de hectares e uma produção total em torno de 7,0 milhões de toneladas (IRGA, 2009; IRGA, 2010). O volume de grãos produzidos evidencia a importância social e econômica dessa cultura e o papel do RS como fornecedor de um alimento básico. Embora a produtividade média obtida no RS esteja entre as mais altas do Brasil, ainda está abaixo do potencial produtivo da cultura, isto porque, em lavouras experimentais ou mais tecnificadas, é comum obter produtividades de 8,0 a 10,0 t ha<sup>-1</sup>.

Desde de 1970-1980, o RS dispõe de genótipos que apresentam elevado potencial produtivo; entretanto, resultados positivos de incrementos de produtividade foram obtidos, principalmente a partir do ano de 2002, através dos programas de transferência de tecnologia em relação às práticas de manejo dessa cultura. De acordo com as avaliações realizadas nesses programas, entre as principais causas do baixo rendimento médio de algumas propriedades, está o inadequado manejo do solo, da água, das práticas culturais e da fertilidade do solo. Com o aumento de produtividade da cultura, há também um aumento na necessidade de nutrientes que devem ser supridos pela adubação. Entre os nutrientes, o nitrogênio é o mais exigido pelas culturas e, devido à instabilidade das suas formas químicas no solo alagado, sua

disponibilidade apresenta flutuações em um intervalo de tempo relativamente curto, compreendido entre o momento da adubação até sua perda do solo, tornando difícil o manejo do fertilizante. A maior demanda de N pela cultura, aliada às perdas da lavoura, é contornada com a aplicação de maiores doses de fertilizantes. Entretanto, isso eleva os custos de produção da lavoura, além de apresentar um potencial poluente para a atmosfera e para os mananciais de água.

Embora um grande volume de pesquisa tenha sido realizada nas últimas décadas envolvendo a nutrição nitrogenada em arroz, ainda persistem alguns pontos a serem melhor esclarecidos sobre a contribuição das formas absorvidas e a eficiência de absorção de N, principalmente para genótipos adaptados às condições regionais do Sul do Brasil.

No arroz cultivado sob alagamento, as condições que determinam a redução química do solo favorecem o aumento da concentração do íon  $\text{NH}_4^+$ , sugerindo que esta seja a principal fonte de N para essa cultura. Por outro lado, para a maioria das espécies de plantas cultivadas, o nitrato é a fonte predominante de N no solo, sendo a principal forma absorvida. No solo alagado, o nitrato é uma forma instável e pode ser rapidamente perdida por desnitrificação e, em função disso não são recomendadas fontes nítricas para o arroz.

Após o alagamento, ocorre o rápido consumo do oxigênio molecular e o solo passa a apresentar condições de anaerobiose. Assim, a demanda de oxigênio criada nas raízes, pelo processo de respiração celular, não é suprida pelo solo em estado de redução. Nesse caso, as plantas sofrem adaptações morfológicas, como a formação de espaços porosos (aerênquima) ao longo das suas estruturas, com a finalidade de transportar oxigênio da atmosfera até as raízes. A intensidade com que o oxigênio se difunde pela planta é dependente do volume de espaços porosos, que é determinado por características anatômicas, como altura da planta, diâmetro do colmo, distribuição do sistema radicular e diâmetro de raízes. Nas raízes, o oxigênio além de ser consumido na respiração, é, em parte, liberado para o solo, devido ao gradiente de oxigênio formado entre o solo quimicamente reduzido e o interior da raiz. O  $\text{O}_2$  liberado na rizosfera é consumido em reações de oxidação e por



microrganismos aeróbios que conseguem se desenvolver nessa região, dentre as quais, estão as bactérias nitrificadoras.

Atualmente, a recomendação de N preconiza a aplicação de doses superiores a  $100 \text{ kg ha}^{-1}$  de N para suprir a necessidade do arroz que, ao longo dos anos, vem sendo geneticamente melhoradas, principalmente no que se refere a aumento de produtividade. Porém, pouca pesquisa tem sido dedicada para identificar e aperfeiçoar características que visem melhorar a eficiência de aproveitamento do N pelas plantas, visto que as suas perdas na lavoura são superiores a 50% do N aplicado. Para que a planta seja eficiente em aproveitar o N fornecido, atenção deve ser dada às características do sistema radicular relacionadas com a absorção. Embora a química do solo alagado determine a instabilidade do nitrato neste ambiente, é reconhecido que há formação de nitrato nas zonas oxidadas do solo alagado. Devido à nitrificação que ocorre na rizosfera do arroz e na superfície do solo, cogita-se que o nitrato constitua parte importante da nutrição nitrogenada para o arroz. Isto porque, estudos mostram que o desenvolvimento do arroz é favorecido quando são administrados o amônio e o nitrato de forma combinada para as plantas. Em função disso, cria-se a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a importância do nitrato para a nutrição do arroz cultivado sob alagamento.

Após entrar na raiz, a passagem do  $\text{NO}_3^-$  pela membrana celular é considerado o passo chave no metabolismo do N. Os processos de transporte de nitrato através da membrana indicam que o influxo de nitrato é um processo ativo, mediado por transportadores específicos. A identificação das proteínas e dos genes que são responsáveis pela entrada do N na planta, é um pré-requisito para melhor entender os mecanismos que controlam a absorção do nitrato. Os genes pertencentes às famílias *NRT1* e *NRT2* são responsáveis por codificar a formação de transportadores de nitrato nas raízes. Embora estes genes sejam classificados como constitutivos, existe uma resposta sobre o aumento da expressão quando ocorre um estímulo por parte do nitrato disponível no meio de crescimento. Tal resposta permite estudar com maior detalhe, a possibilidade de explorar a expressão gênica ou a superexpressão destes genes buscando aumentar a eficiência de absorção de nitrato em arroz.

Genótipos de arroz geneticamente contrastantes apresentam características distintas quanto à fisiologia e morfologia e tais variações podem ser determinantes na formação de aerênquima, no transporte do oxigênio, e na eficiência de absorção de N. Entretanto, pouco se sabe sobre a ocorrência da nitrificação, sua intensidade e influência sobre a planta. Há, portanto, a necessidade de estudar alguns aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos do arroz responsáveis pela formação de aerênquima, pelo transporte e liberação de oxigênio para a rizosfera e a sua relação com a nitrificação e absorção de N. A obtenção de informações referentes a esses aspectos podem dar subsídios para que os programas de melhoramento vegetal possam selecionar plantas com maior capacidade e eficiência na absorção de N.

## **2. CAPÍTULO I – ESTADO ATUAL DO CONHECIMENTO**

### **2.1. O cultivo de arroz irrigado**

O arroz (*Oryza sativa* L.) é um dos alimentos mais importantes para a nutrição humana, sendo a base alimentar de mais de três bilhões de pessoas no mundo. É o segundo cereal mais produzido e consumido e ocupa uma área aproximada de 158 milhões de hectares. São produzidos atualmente cerca de 662 milhões de toneladas de grãos em casca, o que representa aproximadamente, 20% da energia e 15% da proteína necessária à dieta humana. A Ásia ocupa a primeira posição em produção e consumo, enquanto que a América do Sul é a segunda na produção e terceira em consumo (SOSBAI, 2010). Na safra 2008/09, as maiores produções pertenceram à China (30,8%), Índia (22,2%), Indonésia (8,3%), Vietnã (5,4%), Tailândia (4,4%), Filipinas (2,4%) e o Brasil (1,9%) (IRGA, 2010). Esses aspectos evidenciam a importância da cultura no cenário social e econômico mundial.

O Brasil produz atualmente entre 12 e 13 milhões de toneladas de arroz, sendo o nono produtor em nível mundial e o maior na América Latina, responsável por, aproximadamente, 82% da produção do MERCOSUL (Azambuja et al., 2004; SOSBAI, 2010). O Rio Grande do Sul se destaca como o maior produtor nacional, com cerca de 7,0 milhões de toneladas, o que corresponde a 61% do total que, somado com a produção obtida no Estado de Santa Catarina, totalizam 70% do arroz produzido no Brasil, sendo por isso, considerado estabilizador da safra nacional. A área anual cultivada com arroz no RS aumentou até a safra de 2004/05, estabilizando-se em torno de um

milhão de hectares em áreas de várzeas, com pouca perspectiva de aumento devido à limitação na disponibilidade de água. A área cultivada compõe seis regiões localizadas na metade sul do Estado: Fronteira Oeste, Campanha, Depressão Central, Planície Costeira Interna à Laguna dos Patos, Planície Costeira Externa à Laguna dos Patos e Sul (SOSBAI, 2010).

As classes de solos com maior ocorrência nos Estados do RS e SC são os Planossolos e os Gleissolos (> 60 %) e são os que representam a maior área de cultivo de arroz no RS. Entretanto, Vertissolos, Neossolos, Chernossolos, Plintossolos, Organossolos e Espodossolos também são utilizados, porém com algumas limitações (SOSBAI, 2010). Atualmente, os sistemas de cultivo utilizados no RS são o cultivo mínimo, com aproximadamente 61,1% da área, o cultivo convencional, com cerca de 21,3%, e o restante da área é cultivada sob outras formas (pré-germinado, plantio direto, etc.) (SOSBAI, 2010).

A orizicultura praticada no Rio Grande do Sul caracteriza-se pelo cultivo irrigado, em cerca de nove mil lavouras distribuídas em 133 municípios, onde 232 mil pessoas vivem direta ou indiretamente da atividade (SOSBAI, 2010). Segundo levantamento realizado pelo IRGA em 2005, o tamanho médio das lavouras é de 144 ha, sendo que 69,4% das lavouras possuem menos de 100 ha e representaram 18,7% do total de área semeada no Estado; as lavouras com tamanho entre 100 e 500 ha (27%) totalizavam 49,2% da área de cultivo, e as com mais de 500 ha (3,7%) por 32,1% do total do RS (IRGA, 2010). Estima-se que o arroz apresente atualmente um valor bruto de produção de cinco milhões de reais, o que representa mais de 2,74% do PIB do Estado. Em vários dos municípios produtores, o arroz é a principal atividade econômica, chegando a representar mais de 50% da produção total (SOSBAI, 2010).

Nos últimos anos, a produtividade média no RS passou de 5,30 t ha<sup>-1</sup> na safra 2003/04 para 7,28 t ha<sup>-1</sup> na safra 2008/09. Entretanto, este rendimento ainda está abaixo do obtido em lavouras experimentais ou mais tecnificadas, nas quais, é comum obter produtividades superiores a 10 t ha<sup>-1</sup>. Essas diferenças podem ser atribuídas, além de fatores como solo e clima, às práticas de manejo da lavoura, como a semeadura, a irrigação, o controle de plantas daninhas, pragas, doenças e a fertilidade do solo (Duarte, 2006).

O cultivo do arroz requer a utilização de uma ampla gama de insumos e mecanização agrícola, tornando-se a atividade agrícola que apresenta elevados custos de produção. Na safra de 2009/10 o custo total da lavoura de arroz ficou, em média, em R\$ 4.008,00 (IRGA, 2010). Em virtude do elevado custo, é necessário que a pesquisa e os produtores busquem o aumento de produtividade de grãos, para haver uma relação custo-benefício positiva no empreendimento, visto que, nos últimos anos, o preço pago ao produtor tem ficado abaixo do esperado, para garantir uma renda satisfatória com a atividade. Este aspecto vem sendo melhorado no Estado do Rio Grande do Sul com a introdução das variedades modernas e com melhorias no manejo da cultura (Terres et al., 2004). As primeiras cultivares do tipo Indica foram introduzidas no Rio Grande do Sul a partir de 1973, porém somente após 10 anos passaram a ocupar áreas expressivas. Como decorrência do potencial produtivo superior, as cultivares modernas substituíram as dos outros grupos agronômicos e atualmente são cultivadas na quase totalidade da área de arroz irrigado do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (SOSBAI, 2010).

Em virtude da disponibilidade de cultivares que apresentam elevado potencial de rendimento, é necessário adequar as práticas de manejo do solo, da cultura e da resposta à adubação nas diferentes condições edafo-climáticas do Sul do Brasil, considerando que a produtividade da cultura apresenta potenciais diferenciados de produtividade. Estudos na área da fertilidade do solo para o cultivo do arroz têm sido intensificados nas últimas décadas, com o intuito de alcançar maior eficiência nas práticas de fornecimento, manejo e aproveitamento da adubação. Nesse processo, e em decorrência da recente mudança de cenário, resultante principalmente de adequações no manejo da cultura, as respostas do arroz irrigado à adubação tornaram-se significativas, consistentes e com retorno econômico, constituindo-se em um dos fatores mais importantes de produção (SOSBAI, 2010).

Dentre as prioridades, o nitrogênio merece destaque, principalmente pela sua importância no desenvolvimento vegetativo e no rendimento da cultura. Outro aspecto que tem merecido atenção está na crescente preocupação sobre a redução de custos e no seu potencial poluente, visto que, atualmente mais da metade do fertilizante nitrogenado aplicado é perdido da lavoura de arroz, seja para a atmosfera, na forma de amônia ( $\text{NH}_3$ ), óxido

nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) ou mesmo nitrogênio molecular (N<sub>2</sub>) e/ou para mananciais de água.

## **2.2. Solos alagados e a disponibilidade de nitrogênio**

Os solos mal drenados ou cultivados sob alagamento apresentam características distintas dos solos cultivados em condições de sequeiro. Após o alagamento, inicia-se um período de readaptação ou rearranjo das condições de solo, causadas principalmente, pela alteração da atividade microbiana, que determina intensas transformações de ordem bioquímica e química. Após um determinado período, o solo pode atingir um novo estado de equilíbrio, porém, com uma acentuada mudança na sua composição que, conseqüentemente, irá influenciar no desenvolvimento das plantas nesse ambiente.

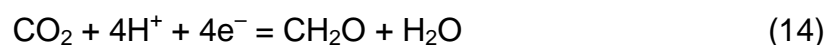
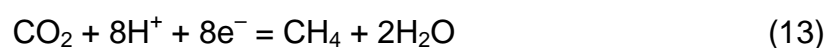
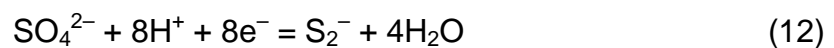
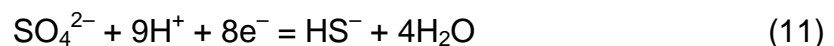
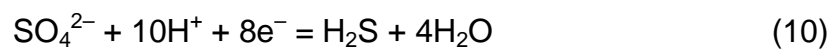
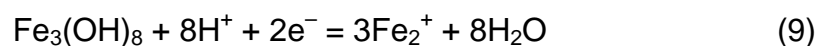
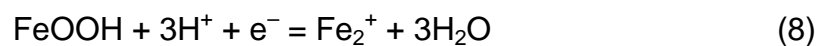
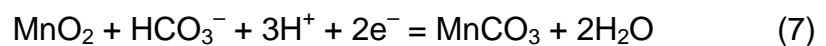
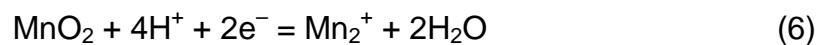
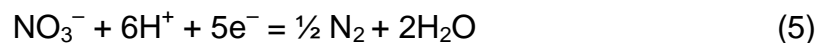
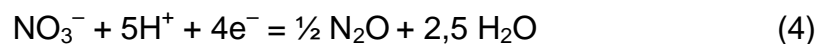
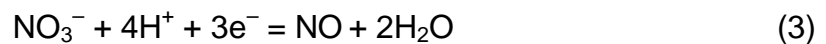
Com a formação da lâmina de água, inicialmente o ar é deslocado dos espaços porosos e o oxigênio molecular livre presente no solo é rapidamente consumido pelos microrganismos aeróbios nos processos biológicos que envolvem a transferência de elétrons na respiração celular (Yoshida, 1975; Kirk, 2004). A lâmina de água em lavouras de arroz normalmente se situa entre 5,0 a 10,0 cm de profundidade e, devido ao movimento da água, aliado ao desenvolvimento de organismos fotossintéticos aeróbios, a oxigenação mantém teores adequados ao desenvolvimento de organismos aeróbios (Kirk, 2004). No entanto, devido à taxa de difusão do O<sub>2</sub> ser aproximadamente 10 000 vezes menor na água do que no ar (Luxmoore et al., 1970; Reddy & DeLaune, 2008), a quantidade de O<sub>2</sub> que se difunde até o solo não é suficiente para manter um ambiente aeróbio no solo, principalmente em subsuperfície (Yoshida, 1975). Como conseqüência disso, nos solos cultivados com arroz, a concentração de O<sub>2</sub> é reduzida a valores próximos a zero em um ou dois dias e ocorre a formação de um gradiente de concentração de oxigênio ao longo do perfil do solo, com uma camada oxidada na superfície e abaixo desta, um solo com pouco ou nenhum oxigênio (Ponnamperuma, 1972; Kirk, 2004). A diferença entre os extremos determina variações nos níveis de oxigênio molecular disponível ao longo do perfil, partindo de um ambiente aeróbio para um semi-anaeróbio (hipoxia) até um totalmente anaeróbio (anoxia) (Reddy & DeLaune, 2008). A espessura da camada oxidada

superficial depende do equilíbrio entre a difusão e o consumo de oxigênio, não ultrapassando em geral a alguns milímetros (Patrick & Sturgis, 1955; Kludze & DeLaune, 1995), porém, é suficiente para manter condições favoráveis ao desenvolvimento de comunidades microbianas aeróbias, mesmo que em níveis reduzidos (Yoshida, 1975). A manutenção de níveis de oxigênio mais elevados na lâmina de água e na camada oxidada do solo ocorre em potenciais redox positivos, em torno de +300 a +500 mV (Ponnamperuma, 1972).

Abaixo da camada oxidada, a disponibilidade de oxigênio torna-se limitada e próxima de zero ( $< 3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ ) (Greenwood, 1961) e a população microbiana aeróbia torna-se inativa ou morre. A partir deste momento, ocorre a proliferação de microrganismos anaeróbios facultativos e obrigatórios que obtém energia da matéria orgânica do solo pelos processos de respiração anaeróbia e fermentação para promover a biossíntese celular (Stainer, 1969; Yoshida, 1975; Moreira & Siqueira, 2002). Para realizar a respiração anaeróbia, os organismos anaeróbios facultativos necessitam de fontes alternativas para servirem de aceptores de elétrons na cadeia respiratória, utilizando para tal, espécies químicas inorgânicas oxidadas, como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{MnO}_2$ ,  $\text{FeOOH}$ ,  $\text{Fe}_3(\text{OH})_8 \text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  e  $\text{H}^+$  (Bartlett & James, 1993), além de moléculas orgânicas contendo oxigênio, oriundas da degradação da matéria orgânica do solo, como glicose, ácidos orgânicos, etc (Ponnamperuma, 1972; Reddy & DeLaune, 2008). Os produtos finais da decomposição da MO nos solos alagados são dióxido de carbono, hidrogênio molecular, metano, amônia, aminas, mercaptanos, gás sulfídrico e resíduos parcialmente humificados (Ponnamperuma, 1972). Além desses, produtos intermediários oriundos da fermentação, como ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como os ácidos fórmico, acético, propiônico, butírico e láctico, podem afetar, em alguns casos, o desenvolvimento das plantas de arroz (Yoshida, 1975; Rao & Mikkelsen, 1977). A alteração desse ambiente tem implicação direta sobre o desenvolvimento das plantas, principalmente, porque é nesta camada de solo, onde ocorre o predomínio do desenvolvimento do sistema radicular das culturas adaptadas a esse meio (Oliveira et al., 1993).

A utilização dos compostos oxidados pelos microrganismos desencadeia uma série de reações de redução química, comumente denominadas de reações redox, que envolvem a transferência de elétrons

oriundos da decomposição da MO e promovem mudanças nas configurações eletrônicas dos elementos, modificando as espécies químicas presentes no solo (Ponnamperuma, 1972; Lindsay, 1979). Algumas reações de redução química que normalmente ocorrem nos solos são apresentadas, de forma simplificada, abaixo (Lindsay, 1979; Reddy & DeLaune, 2008):



As formas químicas resultantes do alagamento influenciam diferentes propriedades do solo e a amplitude dessas variações é basicamente determinada pela intensidade do processo da redução química, determinada pela atividade microbiana, pela disponibilidade de MO e pela composição mineralógica do solo (Ponnamperuma, 1972). A mudança nas condições do solo é tão acentuada que o conhecimento das suas características antes do alagamento normalmente não é suficiente para entender e inferir adequadamente sobre o comportamento da planta de arroz no solo alagado (Vahl & Souza, 2004). Entre as principais alterações químicas e eletroquímicas que afetam a fertilidade do solo, se destacam o decréscimo no potencial redox (Eh), a elevação do pH do solo e da água, o aumento da condutividade



elétrica, da força iônica, da CTC, dos teores de  $\text{NH}_4^+$  (Ponnamperuma, 1972; Reddy & DeLaune, 2008).

Com o consumo de prótons e elétrons, conforme demonstrado nas reações antes apresentadas, ocorre a elevação natural do pH do solo que, aproximadamente após quatro semanas, estabiliza em valores próximos à neutralidade. Como consequência do consumo de prótons e elétrons, ocorre uma mudança no potencial redox do solo, passando de valores positivos (+500 mV) a valores negativos, estabilizando em torno de -300 mV, dependendo do produto de solubilidade, da reatividade e da disponibilidade de cada forma química (Ponnamperuma, 1972; Reddy & DeLaune, 2008). A variação desses fatores influencia diretamente os processos de adsorção e dessorção de íons e, conseqüentemente, a disponibilidade de nutrientes.

A disponibilidade de alguns elementos é alterada, principalmente devido à formação de compostos de maior solubilidade, o que aumenta a sua concentração no solo e influencia diretamente no desenvolvimento das plantas. Dentre os elementos que sofrem as maiores alterações estão o nitrogênio, o ferro, o manganês, o enxofre, o fósforo, o cobre, o zinco e o molibdênio. A redução do ferro  $\text{Fe}^{3+}$  para a forma  $\text{Fe}^{2+}$  aumenta a concentração de ferro solúvel em várias ordens de magnitude após a inundação (Tanaka & Navasero, 1966), ultrapassando em alguns casos,  $300 \text{ mg L}^{-1}$  em quatro semanas de alagamento, com posterior diminuição para concentrações inferiores a 100 ou  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (Vahl & Souza, 2004). Maiores concentrações de ferro normalmente são observados em solos ácidos provenientes de rochas basálticas e com altos teores de MO (Moraes & Dynia, 1992; Velloso et al., 1993). Elevados teores de  $\text{Fe}^{+2}$  na solução do solo podem causar graves injúrias à planta de arroz, por ser esta a forma absorvida pelas raízes (Jugsujinda & Patrick, 1993). A toxicidade por ferro tem sido observada com freqüência na cultura do arroz, principalmente nas lavouras situadas na região oeste do Rio Grande do Sul (Sousa et al., 2004). Além de causar injúrias às plantas, a elevada concentração de ferro no solo tem influência sobre a disponibilidade de outros nutrientes catiônicos, devido ao seu deslocamento do complexo de troca do solo, ou ainda, afetando a sua absorção.

Elementos traço como o cromo, arsênio e selênio também são diretamente influenciados pelas transferências de elétrons nas reações redox,

porém com menor intensidade (Essington, 2005). Por outro lado, embora alguns elementos não participem de forma significativa nas reações de transferência de elétrons, como  $\text{Ni}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  e  $\text{Pb}^{+2}$ , a influência da redução do solo sobre esses elementos se caracteriza principalmente na formação de complexos estáveis, com reduzida solubilidade e mobilidade ( $\text{NiS}$ ,  $\text{ZnS}$ ,  $\text{CdS}$ , e  $\text{PbS}$ ), podendo, em alguns casos, reduzir a sua disponibilidade para as plantas (Essington, 2005).

Entre os nutrientes que mais são afetados pelo alagamento do solo, está o nitrogênio. Entender as transformações do N é imprescindível para manejar o fertilizante nitrogenado, visando obter a máxima eficiência de utilização e minimização de perdas. Antes do alagamento, o solo aerado está em condições de aerobiose e o nitrogênio fornecido via fertilizantes, juntamente com o oriundo da mineralização da MO, é rapidamente transformado a  $\text{NO}_3^-$ , sendo essa, a fonte predominante de N disponível para as plantas (Ponnamperuma, 1972; Britto & Kronzucker, 2005). Após o alagamento, na transição entre o ambiente oxidado a reduzido, as formas de N sofrem alterações no seu estado de oxidação, passando da valência -5 no  $\text{NO}_3^-$ , para +3 no  $\text{NH}_4^+$  (Lindsay, 1979). O  $\text{NO}_3^-$  é instável nas condições de solo alagado por conseqüência da sua elevada afinidade química no processo de redução. Na seqüência de redução, após o consumo do  $\text{O}_2$ , o  $\text{NO}_3^-$  é a primeira molécula a ser reduzida, seguida pelos óxidos de manganês, ferro, enxofre e dióxido de carbono (Lindsay, 1979; Reddy & DeLaune, 2008).

A redução do nitrato ocorre em valores de potencial redox (Eh) positivos, em torno de +200 mV, quando alcança a camada reduzida, onde é rapidamente atacado por microrganismos anaeróbios facultativos, sendo que a sua concentração no solo torna-se próxima de zero. O  $\text{NO}_3^-$  é reduzido e transformado nas formas voláteis de óxido nítrico (NO), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) e  $\text{N}_2$  e se difunde para a atmosfera (Ponnamperuma, 1972), contribuindo para a emissão de gases de efeito estufa, onde o potencial de aquecimento do  $\text{N}_2\text{O}$  é de 310 vezes maior do que o do  $\text{CO}_2$ . A velocidade e a intensidade da desnitrificação dependem, principalmente, da presença de material orgânico de fácil decomposição, do tipo de microrganismos envolvidos, do pH do solo e da temperatura. Considerando que essas condições são extremamente variáveis, a taxa de desnitrificação e, conseqüentemente, o tempo necessário para que o

nitrato desapareça do solo após o início do alagamento, serão também muito diferentes entre solos. Normalmente, o nitrato virtualmente desaparece do solo após três semanas de alagamento, mas em alguns solos, podem ser observadas altas concentrações de nitrato após várias semanas de alagamento (Vahl & Souza, 2004). Buresh et al. (1993) observaram que, entre 60 a 75% do  $^{15}\text{N-NO}_3^-$  aplicado na superfície de um solo alagado, foi perdido por desnitrificação após duas a três semanas. Por outro lado, DeDatta & Buresh (1989) citam que, em alguns casos, as quantidades de N perdidas por desnitrificação em áreas cultivadas com arroz não têm sido significativas. A divergência entre alguns resultados mantém as incertezas sobre o processo, porém, essas diferenças podem estar associadas a cada condição em que o experimento é realizado. Um exemplo disso, está no estudo realizado por Liesack et al. (2000), no qual identificaram variações significativas na concentração de nitrato produzido na camada de 2 – 3 mm de um solo alagado durante o dia, com a incidência de luz solar, em comparação às quantidades produzidas à noite, onde a concentração foi quase zero. Esses autores atribuíram esse efeito à maior produção de  $\text{O}_2$  por organismos fotossintéticos presentes na lâmina de água durante o dia. Ainda, com base nesse estudo, após a observação nos aumentos da concentração de nitrato formado, foram observadas perdas rápidas de N por desnitrificação, principalmente durante a noite.

Paralelamente à desnitrificação, em valores de Eh em torno de +150 mV, as fontes orgânicas e oriundas de fertilizantes que contém N são mineralizadas e transformadas para a forma amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) e, por ser estável nas condições de solo alagado, passa a ser a fonte predominante de N (Ponnamperuma, 1972; Wang et al., 1993; Kronzucker et al., 2000; Essington, 2005). A concentração de amônio disponível no solo varia amplamente entre solos, principalmente entre os períodos compreendidos entre aplicações de fertilizantes. Normalmente, de um a cinco dias após a aplicação de fertilizantes nitrogenados, as concentrações de amônio no solo podem facilmente superar  $180 \text{ mg L}^{-1}$  e declinar até valores inferiores a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  nos períodos seguintes, em função da absorção pelas plantas e das perdas por volatilização, lixiviação e desnitrificação (Kirk, 2004). O amônio disponível na solução do solo tem elevada mobilidade, tanto na lâmina de água, como no perfil do solo, com um

coeficiente de difusão ( $D^0$ ) de  $1,98 \times 10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ s}^{-1}$ , comparado com  $0,79 \times 10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ s}^{-1}$  e  $0,70 \times 10^{-7} \text{ dm}^2 \text{ s}^{-1}$  do  $\text{Ca}^{+2}$  e do  $\text{Mg}^{+2}$  respectivamente (Kirk, 2004). O amônio livre na solução do solo pode difundir-se até as regiões oxidadas na camada superficial do solo, na lâmina de água ou na rizosfera do arroz. Nessas, pode ser transformado a nitrito e nitrato, pela ação dos microrganismos dos gêneros *Nitrossomonas*, *Nitrobacter* e *Nitrospira*, ao longo do período de cultivo do arroz, constituindo-se numa importante fonte de perda de N (Ponnamperuma, 1972; Briones et al., 2003; Vahl & Souza, 2004).

Outro ponto importante associado às perdas de N está relacionado com o aumento do pH da lâmina de água na transformação do  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NH}_3$ . Esta molécula se comporta como uma base fraca e, devido à sua baixa constante de dissociação ( $pK_a$  de  $10^{-9,25}$ ), a desprotonação inicia em pH superior a 7,0 (Kleiner 1981). De acordo com Freney et al. (1981), 99.4% da amônia está na forma protonada em água com pH 7.0 a 25°C. Nos solos alagados, o pH da lâmina de água normalmente se situa entre 6,5 a 7,0, porém apresenta variações durante o dia e em relação à noite. Em alguns casos específicos, a exemplo de quando ocorre a formação de algas fotossintetizantes, o pH da água pode chegar a valores superiores a 8,0 e, nestes casos, haver a formação de  $\text{NH}_3$  (Ponnamperuma, 1972). A  $\text{NH}_3$  produzida se difunde pela da lâmina de água e, posteriormente, é perdida para a atmosfera na forma gasosa (Kirk, 2004). De acordo com Savant & De Datta (1982), as perdas de amônia podem variar de valores negligíveis até 60% do N aplicado, constituindo-se em uma fonte considerável de perda de N na lavoura de arroz. As reações associadas às perdas de N têm recebido grande atenção nos últimos anos e são apontadas como os principais motivos da baixa eficiência agronômica dos fertilizantes nitrogenados, que raramente ultrapassa 50%. Portanto, entender os mecanismos que envolvem a absorção e a assimilação do nitrogênio é um passo importante na busca de práticas de adubação eficientes, visando reduzir o problema das perdas de N da lavoura de arroz.

### 2.3. Absorção e assimilação de nitrogênio

Nos solos agrícolas, o nitrogênio está disponível às plantas principalmente nas formas de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , sob variadas relações e concentrações (Wolt, 1994; Britto & Kronzucker, 2005). Na planta, o nitrogênio é constituinte de diversos componentes bioquímicos e estruturais que atuam na formação do vegetal, como ATP, NADH, NADPH, DNA, RNA, clorofila, aminoácidos, proteínas e enzimas, além de atuar como reguladores de potencial osmótico e do potencial elétrico dentro e fora da célula (Taiz & Zieger, 2004).

A nutrição nitrogenada em plantas tem sido estudada durante décadas, porém, ainda persistem alguns pontos que geram dúvidas e/ou divergências sobre a absorção e a assimilação desse nutriente pelo arroz irrigado. Nos solos cultivados sob alagamento, as condições de redução química favorecem a formação e a elevação da concentração de  $\text{NH}_4^+$ , sugerindo que esta seja a principal fonte de nitrogênio para o arroz (Wang et al., 1993; Kronzucker et al., 2000), ao contrário do  $\text{NO}_3^-$ , que é considerada a principal fonte de N para a maioria das culturas cultivada em solos aerados (Britto & Kronzucker, 2005).

Ao longo da escala evolutiva, as plantas têm desenvolvido diferentes mecanismos fisiológicos, bioquímicos, morfológicos, etc., que as habilitam absorver e metabolizar as formas de N com diferentes eficiências e intensidades, principalmente, em virtude da variabilidade na sua disponibilidade nos solos cultivados (Glass & Siddiqi 1995; Glass et al., 2001).

Os estudos relacionados à absorção de nutrientes tiveram importantes avanços nas últimas décadas, principalmente na área da fisiologia, genética e biologia molecular, com destaque para a identificação de genes responsáveis pela formação dos transportadores de íons localizados na membrana plasmática das células das raízes, suas funções e especificidades. De um modo geral, tem sido observado que a absorção de nutrientes apresenta fases distintas em relação à eficiência e a afinidade pelo nutriente, em resposta à sua concentração no meio de crescimento. Esta eficiência está relacionada ao tipo de transportador atuante e é determinada pelo potencial genético de cada planta. A identificação desses processos tornou-se uma ferramenta importante na obtenção de informações detalhadas sobre a

absorção individual de cada nutriente, bem como sobre as interações entre nutrientes.

### 2.3.1. A absorção e assimilação de $\text{NH}_4^+$

Estudos fisiológicos sobre a absorção de  $\text{NH}_4^+$  em raízes de plantas evidenciaram a existência de dois sistemas de transporte nas membranas celulares, constituídos por transportadores de alta afinidade (High Affinity Transport Systems – HATS) e baixa afinidade (Low Affinity Transport Systems – LATS), sendo que cada tipo de transportador é composto por diferentes genes, os quais comumente são denominados de famílias (Siddiqi et al., 1990; Mäck & Tischner, 1994; Kronzucker et al., 1996; Wang et al., 1993; Crawford & Glass, 1998; Lin et al., 2000).

Ninnemann et al. (1994) inicialmente identificaram o gene *AtAMT1.1*, que codifica um transportador de alta afinidade em *Arabidopsis thaliana* e posteriormente, Gazzarrini et al. (1999) isolaram os homólogos *AtAMT1.2* e *AtAMT1.3*. A partir desse momento, os genes AMTs foram identificados em outras culturas, como tomate (Von Wirén et al., 2000) e arroz (Saiki et al., 2002), e foi observado que esses transportadores atuam preferencialmente em concentrações inferiores a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e são expressos principalmente nas raízes (Ninnemann et al., 1994; Britto & Kronzucker, 2005). Posteriormente, Sohlenkamp et al. (2000) identificaram outro tipo de transportador de amônio. Primeiramente isolado em *Arabidopsis thaliana*, o *AMT2.1* é expresso não somente em raízes mas também em células de folhas. Este gene apresenta um caráter de expressão constitutivo, porém tem sua expressão aumentada na presença de amônio e atua principalmente em concentrações na faixa milimolar, o que sugere ser um transportador de baixa afinidade (Suenaga et al., 2003; Li et al., 2009). Atualmente, 12 genes da família dos AMTs já foram identificados em arroz, sendo eles: *OsAMT1.1*; *OsAMT1.2*; *OsAMT1.3*; *OsAMT2.1*; *OsAMT2.2*; *OsAMT2.3*; *OsAMT3.1*; *OsAMT3.2*; *OsAMT3.3*; *OsAMT4.1* (Suenaga et al., 2003; Li et al., 2009) e *OsAMT5.1* (Deng et al 2007).

Após ser absorvido, o  $\text{NH}_4^+$  é principalmente assimilado nas raízes, com a sua rota de assimilação mediada pelas enzimas glutamina sintetase

(GS) e glutamato sintase (NADH-GOGAT) e, posteriormente, transportado através do xilema para a parte aérea, principalmente na forma de glutamina (Fukumorita & Chino, 1982; Bloom et al., 1992). Quando a planta é submetida à elevadas concentrações externas de  $\text{NH}_4^+$ , há dificuldade em controlar o influxo para dentro das células e, conseqüentemente, quantidades significativas de amônio podem ser transportadas pelo xilema até a parte aérea (Britto & Kronzucker, 2005). Neste caso, sugere-se que a atividade da glutamina sintetase é insuficiente para incorporar todo o  $\text{NH}_4^+$  absorvido pelas raízes em glutamina, antes da translocação para a parte aérea (Schoerring, et al., 2002). De acordo com Kirkby (1968); Holldampf & Barker (1993) e Troelstra et al. (1995), a deficiência no controle da entrada de  $\text{NH}_4^+$  ocorre porque o amônio pode ocupar os sítios de absorção de cátions como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e, devido à necessidade contínua de absorver também esses cátions, a planta expressa genes para formar novos canais transportadores. No entanto, os novos canais também seriam continuamente ocupados pelo  $\text{NH}_4^+$ , aumentando ainda mais sua concentração no tecido da parte aérea e raiz, causando toxidez. O suprimento de N sob a forma amoniacal normalmente é prejudicial para a maioria das culturas, principalmente sob elevadas concentrações, e resulta na alteração de processos bioquímicos e metabólicos e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento das plantas (Britto & Kronzucker, 2005).

Embora a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  seja energeticamente favorável em relação à de  $\text{NO}_3^-$ , com um gasto de 2 ATPs por molécula de  $\text{NH}_4^+$  assimilada, enquanto que o  $\text{NO}_3^-$  necessita de 12 ATPs (Britto et al., 2001), somente um número limitado de espécies apresenta desenvolvimento satisfatório quando o  $\text{NH}_4^+$  é a fonte predominante de N. Nesta categoria, se destacam as plantas que vivem em ambientes alagados, onde há formação de amônio, como é o caso do arroz (Britto et al., 2001; Britto & Kronzucker, 2005). Porém, mesmo em espécies tolerantes, Holldampf & Barker (1993) e Liao et al. (1994) observaram que a exposição ao  $\text{NH}_4^+$  em solução nutritiva pode causar sintomas de toxidez. Os sintomas de toxidez por amônio mais comumente observados são: redução no crescimento foliar e clorose das folhas (Kirkby, 1968; Gerendas et al., 1997), alteração na relação parte aérea/raiz (Boxman et al., 1991; Wang & Below, 1996 e Bauer & Berntson, 1999), decréscimo no rendimento de grãos (Woolhouse & Hardwick, 1966; Chaillou et al., 1986),

redução nos teores de cátions no tecido vegetal (Kirkby, 1968; Holldampf & Barker, 1993; Troelstra et al., 1995) e morte das plantas (Gigon & Rorison, 1972; Magalhães & Wilcox, 1983; De Graaf et al., 1998).

De acordo com Britto et al. (2001), plantas sensíveis ao  $\text{NH}_4^+$  tentam minimizar o efeito do excesso desse íon absorvido pelas raízes estimulando o seu efluxo da célula através das membranas, com gasto de ATP. Esse processo, além de promover o aumento da respiração radicular, pode aumentar o sintoma de toxidez e afetar o crescimento das plantas (Kronzucker et al., 2001). Há evidências de que espécies mais tolerantes ao  $\text{NH}_4^+$ , como o arroz, além de não incrementarem a atividade respiratória em presença de  $\text{NH}_4^+$ , são capazes de manter o equilíbrio termodinâmico. Nessas espécies, a atividade dos canais internos das células media a distribuição do  $\text{NH}_4^+$  de forma passiva, sem custo energético, através da membrana (Britto et al., 2001). Diferenças entre as taxas de absorção e os locais de redução e assimilação do  $\text{NH}_4^+$  e do  $\text{NO}_3^-$  podem influenciar o fluxo das formas nitrogenadas nas raízes e na parte aérea das plantas (Cramer & Lewis, 1993; Chaillou et al., 1991). Em arroz, a distribuição e a concentração da proteína NADH GOGAT, responsável pela assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , é muito influenciada pelo suprimento desse íon (Yamaya et al., 1995) e a sua indução é observada em todos os segmentos radiculares, principalmente na região apical (Tobin & Yamaya, 2001). A indução de NADH GOGAT pode ocorrer de maneira indireta, onde a glutamina, um produto da assimilação do  $\text{NH}_4^+$  via GS, age como um sinalizador para indução de NADH GOGAT (Hirose et al., 1997). A glutamina, produzida durante a assimilação do N, constitui cerca de 42% do total de aminoácidos presentes na seiva do xilema (Hayashi & Chino, 1990) e é a principal forma de N transportado para o desenvolvimento de novos tecidos.

### 2.3.2. A absorção e assimilação de $\text{NO}_3^-$

A absorção de nitrato pelas raízes de arroz é também constituída por um conjunto de transportadores de alta afinidade (HATS) e de baixa afinidade (LATS), semelhante ao que ocorre com o amônio. Em concentrações acima de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  a absorção ocorre predominantemente pelos LATS e em concentrações na faixa micromolar há a predominância de HATS (Glass &



Siddiqi 1995; Crawford & Glass 1998; Forde 2000; Forde, 2002), os quais são codificados pelas famílias de genes denominadas de *NRT1* e *NRT2* respectivamente (Forde 2002; Vidmar et al., 2000; Cerezo et al., 2001). A expressão dos genes que codificam para os HATs é ainda subdividida em induzidos (iHATS) e constitutivos (cHATS) (Wang & Crawford 1996; Crawford & Glass 1998; Forde 2002). Em arroz, quatro *NRT2s* foram identificados, sendo que o *OsNRT2.1* e o *OsNRT2.2* corresponderiam à maior parte do N absorvido pelas plantas nas condições de baixa disponibilidade (Araki & Hasegawa, 2006). A absorção de  $\text{NO}_3^-$  ocorre na forma ativa e contra um gradiente de potencial eletroquímico (Williams & Miller, 2001), no qual os transportadores atuam através de um sistema simporte com transporte simultâneo de  $\text{H}^+$  e  $\text{NO}_3^-$  para o interior da célula (Mistrik & Ullrich, 1996). Atualmente, foram identificados alguns genes da família *NRT1* em arroz, sendo o *OsNRT1.1* apontado como o de maior importância (Lin et al., 2000). Este gene é expresso no tecido de raízes, mais especificamente nas camadas mais externas, epiderme e pêlos radiculares (Lin et al., 2000; Forde, 2002).

Na literatura existem contradições acerca da natureza da classificação dos *NRT1s*. De acordo com Lin et al. (2000), os genes *NRT1* (LATS) são do tipo constitutivos e, portanto, são expressos continuamente no tecido das raízes. Por outro lado, Forde (2002) cita que o mesmo apresenta um caráter induzível de expressão em relação à disponibilidade de nitrato. Assim, há um consenso de que genes constitutivos aumentam o nível de expressão quando são submetidos à presença de nitrato.

É importante salientar que a resposta no nível de expressão de um gene necessariamente não tem uma relação direta com a quantidade de nitrato absorvido. Isto porque, sob diferenças na disponibilidade deste íon, ocorrem variações na absorção, que são determinadas pela afinidade e pela capacidade do transportador envolvido. Este fato é relacionado com a dinâmica enzimática expressa pela cinética de Michaelis Menten. Nesta, os HATS apresentam uma cinética de absorção que inicia na indução ou na ativação do gene em uma determinada concentração mínima ( $C_{\text{min}}$ ) até alcançar o ponto de saturação ( $V_{\text{max}}$ ), que corresponde ao momento em que todos os transportadores expressos estão saturados. Para esta família de genes, isso ocorre em valores que variam de 10 a 100 micromolar, enquanto que os LATS apresentam um

comportamento linear de absorção, alcançando a saturação somente em concentrações elevadas, normalmente na faixa milimolar, dependendo do transportador envolvido (Xu et al., 2009).

O  $\text{NO}_3^-$ , depois de absorvido, pode seguir por diferentes rotas: 1) efluxo para o apoplasto (Touraine et al., 2001); 2) redução a  $\text{NO}_2^-$ , pela ação da enzima redutase do nitrato (NAR) (Vaughn & Campbell, 1988 e Touraine et al., 2001), 3) redução a  $\text{NH}_4^+$  nos cloroplastos ou plastídeos de raízes pela redutase do nitrito (NIR) e posterior assimilação e produção de aminoácidos (Vaughn & Campbell, 1988); 4) acumulação no interior do vacúolo das células radiculares e 5) transporte para a parte aérea, via xilema e, posteriormente, redução pela ação das enzimas NAR e NIR, localizadas no citosol das células do mesofilo (Touraine et al., 2001). O local de redução do  $\text{NO}_3^-$  varia com as espécies de plantas e com sua taxa de absorção, podendo ser quimicamente reduzido ou armazenado nas raízes ou transportado para a parte aérea e reduzido nas folhas. Na grande maioria das plantas, o  $\text{NO}_3^-$  é transportado para as folhas, assimilado e metabolizado em vários compostos orgânicos, utilizando redutores fornecidos pela fotossíntese (Lips et al., 1990; Takei et al., 2002).

Em geral, a maioria das plantas apresenta maior desenvolvimento quando as duas fontes de N estão presentes no meio de cultivo (Crawford & Glass, 1998). Entretanto, como o amônio é a forma predominante de N nos solos alagados, pouca importância é dada à contribuição do nitrato na nutrição do arroz. A ocorrência da formação de aerênquima, o transporte de  $\text{O}_2$  e perda radial de oxigênio nas raízes, com conseqüente oxidação da rizosfera e nitrificação, são assuntos discutidos de longa data (Armstrong, 1969). Entretanto, devido à dificuldade de determinar precisamente a nitrificação na rizosfera, somente nos últimos anos, maior atenção tem sido dada à possibilidade da transformação de  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NO}_3^-$  na rizosfera do arroz e da contribuição do nitrato no suprimento de N (Briones et al., 2002; Briones et al., 2003; Kirk & Kronzucker, 2005; Duan et al., 2006 e Li et al., 2006). Kirk (2001) relata que quantidades significativas de  $\text{NO}_3^-$  podem ser produzidas na rizosfera do arroz. Cox & Reisenauer (1973), Kronzucker et al. (1999), Kronzucker et al. (2000), Duan et al. (2006) e Duan et al. (2007) observaram que, plantas de arroz cultivadas em solução nutritiva contendo proporções

variáveis de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , mostraram ser mais eficientes em absorver N em comparação às fontes fornecidas isoladamente. Duan et al., (2007) atentam que o efeito sobre a absorção e o rendimento pode variar entre cultivares de uma mesma espécie e até mesmo entre estádios de desenvolvimento. O fornecimento de  $\text{NO}_3^-$ , além de ser fonte de N, parece ter um efeito estimulatório ou sinérgico sobre a absorção de  $\text{NH}_4^+$  (Kronzucker et al., 1999), o que pode estar relacionado com a sinalização bioquímica para expressar famílias de genes que codificam a formação de transportadores de amônio (AMTs) (Siddiqi et al., 1990; Crawford & Glass, 1998; Forde, 2000). Nesse caso, supõe-se que plantas que possuem uma maior capacidade de oxidar a rizosfera teriam condições de intensificar a nitrificação e, desta forma, potencializar a absorção de N.

A eficiência na absorção e na utilização do N pode ser definida e avaliada de diferentes maneiras, porém certamente está relacionada com o potencial genético das cultivares de arroz e é regulada por vários genes (Gallais & Hirel, 2004; Good et al., 2004). Com base na evolução das técnicas de biologia molecular, buscar a maior expressão de genes tornou-se uma importante ferramenta para obter plantas mais eficientes em diversos aspectos, entre eles, explorar a capacidade dos transportadores de nutrientes nas células das raízes (Forde, 2002; Suenaga et al., 2003; Li et al., 2009).

## **2.4. Morfologia do sistema radicular do arroz**

### **2.4.1. Tipo de raízes e distribuição no solo**

Nas plantas cultivadas em solos aerados, o desenvolvimento e o aprofundamento do sistema radicular são muito influenciados pela disponibilidade de água e de nutrientes no perfil do solo (Tinker & Nye, 2000). Por outro lado, no solo alagado, o desenvolvimento das raízes é basicamente governado pela disponibilidade de nutrientes, oxigênio e produtos tóxicos (Matsuo & Hoshikawa, 1993; Kirk, 2004). De acordo com esses autores, em média, o comprimento e a densidade de raízes são equivalentes entre plantas de sequeiro e de ambientes alagados, porém, o que difere é razão entre as raízes que se desenvolvem na camada superficial e em profundidade.

O sistema radicular do arroz é dividido em três tipos: as seminais (radícula), as raízes do mesocótilo (que raramente se desenvolvem) e as raízes nodais (adventícias). Estas correspondem à maior parte do sistema radicular e são as principais responsáveis pela absorção de nutrientes. O desenvolvimento das raízes adventícias ocorre desde o perfilhamento, com um pico máximo de crescimento no estágio de diferenciação da panícula até à floração, momento que coincide com as taxas máximas de absorção de nutrientes e com o maior crescimento da parte aérea do arroz (Lopes, 1991). Na medida em que se alongam, emitem uma série de raízes laterais, que se ramificam até a sexta ordem, com diâmetro médio de 0,1 a 0,2 mm e 1 a 2 cm de comprimento. Essas raízes apresentam menor porosidade (1 – 2%) do que as principais e desenvolvem pouco ou nenhum espessamento das paredes secundárias (Matsuo & Hoshikawa, 1993). As raízes laterais ocupam um pequeno volume de solo e da biomassa total de raízes e se desenvolvem basicamente próximo à superfície. Entretanto, por estarem conectadas diretamente aos vasos do xilema, contribuem para a maior parte da absorção de água e de nutrientes (Matsuo & Hoshikawa, 1993).

No melhoramento de plantas de arroz, a busca por incrementos de produtividade, normalmente gera um aumento na demanda por nutrientes, levando à necessidade de uma maior capacidade de absorção e utilização dos nutrientes pela planta. Mesmo com a introdução de genótipos do tipo moderno com alta capacidade produtiva, pouca atenção tem sido dada à busca de características do sistema radicular que estejam associados a maior capacidade de absorção de nutrientes. De acordo com Lopes et al. (1994) e Abichequer (2004), o sistema radicular do arroz se desenvolve principalmente na camada superficial do solo, sendo que, em torno de 40 - 50% se concentra na camada de 0-5 cm de solo e de 90% na camada de 0-20cm .

A concentração de raízes reduz o volume de solo explorado e aumenta a competição entre as raízes por nutrientes, podendo causar o esgotamento de nutrientes e influenciar a capacidade de absorção da planta. Sistemas radiculares com distribuição mais uniforme no perfil e que alcançam camadas mais profundas conseguem explorar um maior volume de solo, podendo ser desejável, no sentido de aumentar a eficiência de absorção.

#### 2.4.2. Formação de aerênquima e suprimento de O<sub>2</sub> no arroz

A manutenção de uma lâmina de água assegura que a sua disponibilidade seja adequada durante todo o ciclo da cultura do arroz. No entanto, com o alagamento, as plantas encontram uma série de dificuldades para se desenvolver normalmente no solo alagado, decorrentes da falta de oxigênio, da exposição a produtos tóxicos, como ácidos orgânicos e toxinas oriundas do metabolismo afetado pela falta de O<sub>2</sub>, de elevadas concentrações de íons solúveis, como ferro e manganês, entre outras (Kirk, 2004).

Os fatores que afetam o desenvolvimento das plantas no solo alagado exigem que as plantas desenvolvam mecanismos que lhes permita transportar O<sub>2</sub> até as raízes, visando manter a respiração e, conseqüentemente, sua atividade e crescimento (Jackson & Armstrong, 1999). A mais importante adaptação está relacionada à formação de espaços porosos no interior dos tecidos da parte aérea e das raízes, comumente denominados de aerênquima (Jackson & Armstrong, 1999; Evans, 2003; Kirk, 2004). A formação de aerênquima ocorre em diversas espécies de plantas e é o principal fator que determina a sua sobrevivência em ambientes alagados (Jackson & Armstrong, 1999) e ocorre de duas maneiras: na primeira, denominado de esquizógeno ou constitutivo, o espaço poroso resulta da separação e expansão das células, formando espaços intercelulares, o qual faz parte do desenvolvimento normal das plantas mesmo na presença de O<sub>2</sub> em níveis adequados (Jeffree et al., 1986). Esse tipo de formação difere entre espécies, devido ao tipo de arranjo das células que compõem os tecidos (Evans, 2003). O segundo tipo de aerênquima, denominado de lisígeno, é formado devido à morte das células que compõem os tecidos do colmo e da raiz e é desencadeado pelas condições adversas impostas pelo ambiente de solo alagado, principalmente a falta de oxigênio (Jackson & Armstrong, 1999; Evans, 2003). Este tipo de formação resulta em grandes vazios no córtex do colmo e da raiz da planta, formando um continuum entre a atmosfera - parte aérea - raiz, que favorece a difusão dos gases, sejam da atmosfera para a raiz, como ocorre para o oxigênio ou o caminho inverso, para gases como o metano e o CO<sub>2</sub> (Evans, 2003; Kirk, 2004; Groot et al., 2005). O início da formação do aerênquima lisígeno ocorre poucas horas após ser percebida a redução nos

níveis internos de oxigênio (Jackson, 1985; Evans, 2003). A falta de O<sub>2</sub> inicia uma série de processos metabólicos que promovem a formação de substâncias que atuam como sinalizadores bioquímicos, sendo a principal delas, o etileno, a partir das quais é desencadeada a morte celular programada das células (Jackson, 1985). O aerênquima lisígeno é a forma que mais contribui para o fornecimento de O<sub>2</sub> às raízes do arroz (Justin & Armstrong, 1991), podendo constituir mais de 30% do volume total dos tecidos (Luxmoore et al., 1970).

A formação do aerênquima lisígeno inicia-se nas raízes, principalmente nas adventícias, e se estende para a base da planta e, posteriormente, para a parte aérea (Thomson et al., 1990). A desestruturação dos tecidos que compõem o aerênquima ocorre na região do córtex de raízes e colmos e, portanto, é variável com a espessura dessa estrutura (Armstrong, 1979; Sorrel et al., 2000). Diferenças no volume de espaços porosos podem ser observadas em diferentes tipos de raízes e mesmo ao longo de uma mesma raiz. Em arroz, Armstrong (1971) observou volumes de aerênquima de 9% na ponta da raiz e de 45% em regiões maduras e próximas da base da planta.

A efetividade do transporte interno de O<sub>2</sub> por difusão ou convecção depende da resistência física ao movimento dos gases e da demanda de O<sub>2</sub>. A resistência física é uma função da área da secção transversal do órgão da planta, da tortuosidade dos poros e da distância a ser percorrida (Kirk, 2004). Já a demanda de O<sub>2</sub> é uma função das taxas de respiração dos tecidos das raízes e das perdas para o solo, em função do que é consumido nas reações químicas e pelos microrganismos (Kludze et al., 1993; Hosono & Nouchi, 1997; Kirk, 2004). Estes fatores estão diretamente relacionados ao potencial genético da planta, sugerindo que haja diferenças entre espécies e até mesmo entre cultivares, como é o caso do arroz (Aulakh et al., 2000).

Plantas que possuem maior capacidade de formar espaços porosos teoricamente transportam mais oxigênio para a ponta das raízes, favorecendo o seu crescimento, e conseqüentemente, um maior aprofundamento no solo, podendo ser desejável em vista do volume de solo explorado na busca por nutrientes (Ponnamperuma, 1972).

### 2.4.3. Perda radial de oxigênio nas raízes e oxidação do ferro

O oxigênio transportado até a raiz pode em parte, se difundir para o solo, em virtude do gradiente de  $O_2$  criado entre o solo e o interior da raiz. A intensidade com que ocorre essa perda é determinada por características da raiz, como o tipo, a idade, o espessamento da parede celular, a região e o volume de espaços porosos (Clark & Harris, 1981; Colmer, 2003, Kirk, 2004). O acúmulo de suberina nas camadas epidérmicas da raiz resulta no espessamento secundário das paredes celulares e atua como uma barreira que reduz a liberação de  $O_2$  (Kirk, 2004). O espessamento dessas camadas varia ao longo da raiz, à medida que esta se torna mais velha, sendo, portanto, mais permeável nas zonas de crescimento (Armstrong, 1979; Kirk, 2004). Condições ambientais, como variações na temperatura, têm marcada influência no processo de transporte e liberação de  $O_2$  no solo, devido ao aumento na taxa metabólica das raízes e ao aumento da atividade de microrganismos que se desenvolvem na rizosfera (Colmer, 2003).

Devido à variação no volume de aerênquima, a quantidade de oxigênio transportada e liberada pelas raízes do arroz pode variar entre cultivares (Bedford et al., 1991; Sorrell & Armstrong, 1991), o que sugere diferenças na capacidade de formar um ambiente hipóxico ou aeróbio na rizosfera. Essa variação pode influenciar a atividade dos microrganismos aeróbios, afetando a intensidade das reações químicas e biológicas junto à rizosfera e, conseqüentemente, a disponibilidade de alguns nutrientes para as plantas (Colmer, 2003). Entretanto, Kirk (2004) cita que o sistema radicular do arroz pode liberar quantidades expressivas de oxigênio na rizosfera sem comprometer as necessidades internas de  $O_2$  para a respiração celular.

A liberação de oxigênio na rizosfera em função da permeabilidade da raiz resulta, de certa forma, numa adaptação que permite a proteção da rizosfera ao efeito da toxidez dos produtos da redução do solo, que podem causar desordens fisiológicas nas plantas e afetar o desenvolvimento e rendimento (Ponnamperuma et al., 1955; Luxmoore et al., 1970; Camargo et al., 1993ab). A formação da placa férrica tem sido associada também, a um possível mecanismo de tolerância ao ferro em solos alagados, no sentido de reduzir sua entrada nas células. Entretanto, a acumulação de  $Fe^{+3}$  também tem

sido apontada como uma barreira contra a absorção normal de outros nutrientes essenciais (Chen et al., 1980).

A transformação da forma férrica ( $\text{Fe}^{+3}$ ) para a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{+2}$ ) durante o processo de redução do solo aumenta a solubilidade de compostos de ferro e, conseqüentemente, a sua disponibilidade. A liberação de oxigênio na rizosfera possibilita a oxidação do ferro, gerando novamente a forma  $\text{Fe}^{+3}$ . Esta oxidação resulta na acumulação de ferro na superfície das raízes e nas camadas de células que formam a epiderme (Tanaka et al., 1966), na forma de oxihidróxido de ferro pouco cristalinizado, comumente denominada de placa férrica (Chen et al., 2006). De acordo com Chen et al. (1980), a formação da placa férrica é variável entre cultivares de arroz e, até mesmo, entre estádios de desenvolvimento. Em arroz, Begg et al. (1994) obtiveram perdas que variaram de 0,1 a 1,2  $\text{nmol dm}^{-2} \text{s}^{-1}$  em estimativas realizadas em função das taxas de oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  em  $\text{Fe}^{+3}$  na superfície das raízes. Kirk & Bajita (1995) observaram perdas que variaram entre 0,1 a 0,2  $\text{nmol dm}^{-2} \text{s}^{-1}$  com o mesmo procedimento experimental utilizado por Begg et al. (1994), porém, com baixos teores de ferro na solução do solo. Entretanto, é importante citar que a oxidação do ferro corresponde a apenas parte do oxigênio liberado nas raízes, porque o consumo pelos microrganismos que se desenvolvem na rizosfera pode ser até maior do que o utilizado na oxidação do ferro (Kirk, 2004). Uma prova para isso, são os resultados observados por Revsbech et al. (1999), que obtiveram valores de 1,0 a 3,0  $\text{nmol dm}^{-2} \text{s}^{-1}$ , em medidas realizadas com microeletrodos na superfície das raízes no mesmo solo utilizado por Kirk & Bajita (1995). Entretanto, a determinação da quantidade de ferro oxidado na superfície das raízes pode servir como parâmetro para diferenciar cultivares quanto à sua capacidade de transportar e liberar oxigênio na rizosfera.

Os objetivos gerais do trabalho são de avaliar aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos do sistema radicular de genótipos de arroz cultivados no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina, com o intuito de contribuir com informações sobre a importância do suprimento de nitrato para o arroz em solos alagados, visando aumentar a eficiência de absorção e utilização de nitrogênio aplicado via fertilizantes.



### **3. CAPÍTULO II - ESTUDO 1: RESPOSTA DO ARROZ CULTIVADO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA A DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO**

#### **3.1. Experimento 1 - Resposta do arroz irrigado ao suprimento combinado de amônio e nitrato <sup>(1)</sup>**

##### **3.1.1. Introdução**

O suprimento, a forma preferencialmente absorvida e a assimilação de N pelas plantas têm sido amplamente estudados, gerando grandes avanços na área, porém com divergências sobre alguns aspectos (Britto et al., 2001; Britto & Kronzucker, 2002; Tobin & Yamaya, 2001; Forde, 2002). No arroz irrigado, ainda persistem dúvidas sobre a disponibilidade e as formas absorvidas pela planta, principalmente porque, no solo alagado, o ambiente anaeróbico propicia a elevação da concentração de  $\text{NH}_4^+$  (Ponnamperuma, 1972). Por isso, o amônio é considerado a principal fonte de nitrogênio mineral disponível para o arroz (Wang et al., 1993; Kronzucker et al., 2000). Por outro lado, o  $\text{NO}_3^-$  é considerado a principal fonte de N para a maioria das espécies de plantas cultivadas, principalmente em solos aerados (Epstein & Bloom,

---

<sup>(1)</sup> Trabalho publicado na Revista Brasileira de Ciência do Solo, 33:1323-1331, 2009.

2006; Britto & Kronzucker, 2002). No solo alagado, a baixa disponibilidade de compostos oxidados, que servem como aceptores de elétrons para os microrganismos anaeróbios determina a instabilidade do nitrato, sendo rapidamente desnitrificado e perdido para a atmosfera (Ponnamperuma, 1972).

Para Gigon & Rorison (1972), Britto & Kronzucker (2002) e Kronzucker et al. (2000), o nitrogênio fornecido na forma de  $\text{NH}_4^+$  causa uma série de distúrbios fisiológicos no interior e no exterior das células, caracterizando toxidez às plantas. Sintomas de toxidez por  $\text{NH}_4^+$  foram observados em várias espécies, entre elas estão o tomate e a ervilha (Claassen & Wilcox, 1974), a batata (Cao & Tibbits, 1998), a cevada (Britto et al., 2001), o feijão (Zhu et al., 2000) e a beterraba (Harada et al., 1968). A toxidez ao amônio é variável entre as espécies, podendo ser tolerado por algumas, como tem sido atribuído à cultura do arroz (Wang et al., 1993; Kronzucker et al., 2001; Britto & Kronzucker, 2002; Kronzucker et al., 2000). No entanto, mesmo espécies consideradas tolerantes podem apresentar sintomas de toxidez, principalmente quando associado a baixos níveis de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  ou sob concentrações elevadas de N (Holldampf & Barker, 1993; Speer & Kaiser, 1994; Britto & Kronzucker, 2002). Os efeitos da toxidez por amônio normalmente reduzem o desenvolvimento de biomassa de raízes e parte aérea das plantas e as quantidades de nitrogênio absorvido e, em casos severos, pode ocasionar a morte da planta (Gigon & Rorison, 1972).

Por outro lado, Duan et al. (2006) e Duan et al. (2007) relatam que plantas de arroz cultivadas sob proporções variáveis de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , mostraram ser mais eficientes em absorver N em comparação às mesmas formas fornecidas isoladamente e que o efeito sobre a absorção e o rendimento pode variar entre cultivares de uma mesma espécie e entre estádios de desenvolvimento em que são aplicadas.

### **3.1.2. Hipóteses**

- O suprimento combinado de amônio e nitrato favorece o desenvolvimento do sistema radicular do arroz em comparação à fonte isolada, proporcionando uma maior exploração de volume de substrato e, conseqüentemente, maior aproveitamento do nitrogênio aplicado.
- O fornecimento de nitrogênio na forma de  $\text{NH}_4^+$  pode causar

toxidez ao arroz.

### 3.1.3. Objetivos

- Comparar genótipos de arroz quanto à morfologia e à arquitetura de raízes;
- Avaliar o efeito das combinações de amônio e nitrato no desenvolvimento e no rendimento de parte aérea e de raízes;
- Avaliar a relação da morfologia e arquitetura de raízes de arroz com a eficiência na absorção e no uso do nitrogênio.

### 3.1.4. Material e métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – RS) no período de setembro a novembro de 2007. As Unidades Experimentais (UEs) foram constituídas de recipientes de polietileno (vasos) com capacidade para 10 litros. Como substrato, foi utilizado poliestireno cristal granulado, material inerte e de densidade superior a da água, objetivando criar um meio no qual ocorra um desenvolvimento e distribuição do sistema radicular do arroz semelhantemente ao cultivado em condições naturais. A Radiação Fotossinteticamente Ativa (RFA) média dentro da casa de vegetação foi determinada pelo sensor modelo Quantum da marca LI-COR, sendo equivalente a  $770 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ , o que corresponde a 45% da RFA máxima.

O experimento foi conduzido em solução nutritiva e os tratamentos constaram das seguintes proporções entre  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ : 100:0, 75:25 e 25:75. Para compor os tratamentos, foram utilizadas as seguintes fontes:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . As concentrações finais de cada solução são apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1** - Concentração de nutrientes da solução nutritiva que compõe as proporções de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva

Nutriente	Proporções		
	$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$
	----- mmol L <sup>-1</sup> -----		
N	10,0	10,0	10,0
P	1,0	1,0	1,0
K	2,0	2,0	3,0
Ca	1,0	1,0	1,5
Mg	1,0	1,0	1,5
S	6,0	4,0	1,0
Cl	2,0	2,0	1,0

A solução contendo micronutrientes foi composta por: Mn - ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (0,0047 mmol L<sup>-1</sup>), Cu - ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (0,0047 mmol L<sup>-1</sup>), Zn - ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (0,0015 mmol L<sup>-1</sup>), B - ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (0,023 mmol L<sup>-1</sup>), Mo - ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (0,00011 mmol L<sup>-1</sup>) e Fe-EDTA - (Fe - 0,5 mg L<sup>-1</sup>).

Os genótipos de arroz avaliados foram o IRGA 417, pertencente ao grupo moderno (Indica) e Sasanishiki (Japônica). Os vasos foram dispostos obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, totalizando 18 vasos.

As sementes foram previamente embebidas em água durante 24 horas e, posteriormente, seis delas foram colocadas para germinar diretamente em cada vaso, no substrato, contendo somente água destilada. Aos quatro Dias Após a Emergência (DAE), estágio V1 (Counce et al., 2000) foi iniciado o fornecimento de 2,5 litros de solução nutritiva em cada vaso. Aos sete DAE, momento em que as plantas iniciavam a emissão da terceira folha estágio V2 (Counce et al., 2000), foi realizado o desbaste, mantendo-se uma planta em cada vaso. Os vasos foram mantidos cobertos com uma lâmina de poliestireno expandido (isopor®) com espessura de 2,5 cm com um orifício central para dar suporte às plantas, evitar a entrada direta de luz e reduzir a evaporação da solução. As soluções foram trocadas seis vezes durante a condução do experimento, mantendo-se o pH próximo a 6,0, semelhantemente ao normalmente encontrado em solos alagados (Ponnamperuma, 1972) ou quando houvesse uma redução no nível de solução causada pela evapotranspiração.

As plantas foram colhidas aos 38 DAE, estágio V7-V8 (Counce et al., 2000), cortando-as rente ao colo da planta. A solução foi drenada e os vasos, juntamente com o substrato e as raízes foram secos em estufa a 60° C, com o objetivo de manter a arquitetura das raízes inalterada. A parte aérea também foi seca em estufa de ar forçado a 60°C até peso constante, para a determinação da matéria seca. As raízes foram cortadas em segmentos de 5,0 cm e, posteriormente, coradas com uma solução de azul de bromotimol e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>. Para cada camada de 5 cm, as raízes foram dispostas sobre um filme transparente e escaneadas. As imagens digitais foram ajustadas com o software Photoshop<sup>®</sup>, versão 10.0, para posterior determinação do comprimento das raízes com auxílio do software SIARCS<sup>®</sup> 3.0, conforme Crestana et al. (1994).

A parte aérea e as raízes foram moídas em micromoinho e as amostras submetidas à digestão ácida, para posterior determinação dos teores de N, K, Ca e Mg (Tedesco et al., 1995).

### **3.1.5. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise da variância ( $p < 0,05$ ) e, quando significativos, foi feita a comparação entre médias dos tratamentos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

### **3.1.6. Resultados e discussão**

#### ***3.1.6.1. Produção de biomassa e efeito dos íons $NH_4^+$ e $NO_3^-$ no desenvolvimento das plantas***

Os genótipos diferenciaram-se entre si quanto à produção de biomassa na parte aérea e total, exceto para as raízes no tratamento  $NH_4^+$  100:0  $NO_3^-$  (Tabela 2), sendo que a cultivar IRGA 417 foi superior à Sasanishiki, evidenciando o contraste genético das cultivares. Quando comparadas as proporções entre amônio e nitrato, a maior produção de biomassa de parte aérea, raiz e total na cultivar IRGA 417 foi obtida no

tratamento  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 2). Para a cultivar Sasanishiki, não houve diferença na produção de biomassa; entretanto, a variação seguiu o mesmo comportamento observado na IRGA 417 em cada proporção entre amônio e nitrato. Mesmo que as diferenças tenham sido pouco expressivas, elas sugerem que o suprimento combinado de amônio e nitrato proporcionou maior desenvolvimento das plantas do que o amônio suprido isoladamente, como também observado por Kronzucker et al. (1999); Duan et al. (2006) e Duan et al. (2007).

**Tabela 2** - Biomassa da parte aérea, raízes e relação raiz/parte área de cultivares de arroz em função de proporções de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva

Proporções	Parte aérea	Raiz	Total	Raiz/parte aérea
----- g planta <sup>-1</sup> -----				
----- IRGA 417 -----				
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	1,50 b <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	0,38 cA	1,88 bA	0,26 bB
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	2,27 aA	0,69 aA	2,95 aA	0,30 abA
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	1,66 bA	0,52 bA	2,18 bA	0,31 aA
----- Sasanishiki -----				
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	0,99 aB	0,33 aA	1,32 aB	0,33 abA
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	1,35 aB	0,39 aB	1,74 aB	0,29 bA
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	1,09 aB	0,37 aB	1,45 aB	0,34 aA

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas iguais dentro de cada cultivar não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ );

<sup>2</sup> Médias seguidas por letras maiúsculas iguais entre cultivares nas linhas não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

As plantas de ambas as cultivares apresentaram sintomas de toxidez por  $\text{NH}_4^+$  em todos os tratamentos. Na IRGA 417, a toxidez foi mais expressiva em relação à Sasanishiki. No tratamento  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$ , os sintomas eram visíveis aos 25 DAE nas duas cultivares, o que causou uma menor produção de biomassa nesse tratamento (Tabela 2). Os sintomas se manifestaram, em primeiro lugar, nas folhas mais velhas na forma de manchas cloróticas, evoluindo para a necrose, da bainha para o centro. Isto sugere que a toxidez por  $\text{NH}_4^+$  está relacionada a um efeito acumulativo na parte aérea (Britto & Kronzucker, 2005). Sintomas semelhantes se manifestaram nos demais tratamentos, porém com baixa intensidade e somente aos 33 e 36 DAE para as proporções  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  25:75  $\text{NO}_3^-$  respectivamente.

Embora possam ser encontradas concentrações de até 20,0 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> em solos agricultáveis (Wolt, 1994), a concentração de 10,0 mmol L<sup>-1</sup> de N utilizada no experimento pode ter sido a causa da toxicidade, mesmo nas proporções contendo nitrato. Isto pode ter ocorrido porque a solução era renovada constantemente e, desta forma, a concentração era mantida praticamente constante durante o período de cultivo, ao contrário do que acontece no cultivo a campo, em que as interferências do ambiente determinam variações na concentração, principalmente devido às perdas.

Nas concentrações de amônio entre 1,0 e 40,0 mmol L<sup>-1</sup>, a absorção ocorre predominantemente por transportadores de baixa afinidade (Low Affinity Transport Systems - LATS), de maneira passiva, o que afeta o controle de entrada do NH<sub>4</sub><sup>+</sup> na célula, causando seu acúmulo (Wang et al., 1994). De acordo com Britto & Kronzucker (2002), a assimilação de amônio ocorre predominantemente nas raízes, ao contrário do nitrato que ocorre predominantemente na parte aérea. Nesse caso, quando o controle da entrada de amônio pela membrana plasmática é afetado, maiores quantidades são transportadas para a parte aérea, podendo causar o acúmulo e, conseqüentemente, a toxidez. O maior desenvolvimento da parte aérea da cultivar IRGA 417, em relação à Sasanishiki, sugere a ocorrência de uma maior taxa transpiratória devida à maior área foliar o que, conseqüentemente, determina uma maior absorção de água. O maior fluxo de água pela planta acarretará na maior absorção de nutrientes, principalmente os que são transportados por canais menos seletivos na membrana plasmática. Por isso, mesmo nas menores proporções, a quantidade de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> presente deve ter sido suficientemente elevada para causar toxidez.

O comportamento acumulativo desse elemento nas células e sua relação com a toxidez foram também observados por Britto et al. (2001), que encontraram concentrações de amônio superiores a 100,0 mmol L<sup>-1</sup> no citosol de cevada e arroz sob concentrações externas de 10,0 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Sintomas de toxidez semelhantes também foram relatados por Gigon & Rorison (1972); Britto & Kronzucker (2002) e Kronzucker et al. (2000) em diversas culturas. Para Kosengarten et al. (1997), um dos possíveis mecanismos causadores da toxidez ao amônio é a acidificação na rizosfera e, principalmente, no interior das células, ocasionado pela absorção de cátions

( $\text{NH}_4^+$ ) e liberação de hidrogênios ( $\text{H}^+$ ). A acidificação do meio resulta na despolarização da membrana, ocasionando distúrbios em diversos processos metabólicos (Wang et al., 1993; Britto et al., 2001).

Um sintoma característico observado quando há toxidez por  $\text{NH}_4^+$  é a redução da relação raiz/parte aérea (Haynes & Goh, 1978). Na IRGA 417, a menor relação raiz/parte aérea ocorreu quando o amônio foi fornecido isoladamente, sendo que, para a Sasanishiki, como os sintomas de toxidez foram menos expressivos, isso não ocorreu (Tabela 2). Conforme Britto & Kronzucker (2002), ocorre uma inibição do desenvolvimento do sistema radicular devido ao aumento das taxas respiratórias pelo estresse causado pelo amônio, resultando em maior gasto energético. Plantas supridas com  $\text{NH}_4^+$  aumentam a demanda por fotoassimilados que são alocados da parte aérea para as raízes, necessários para que ocorra a assimilação do  $\text{NH}_4^+$  (Murphy & Lewis, 1987). Assim, a partição dos fotoassimilados entre a parte aérea e as raízes resulta no menor crescimento relativo da parte aérea, afetando o desenvolvimento da planta. Kronzucker et al. (2000) e Britto et al. (2001) relatam que a incapacidade de controlar o influxo de  $\text{NH}_4^+$  na célula ativa um mecanismo de efluxo desse íon. Tal mecanismo tem sido denominado por esses autores de ciclagem fútil e o efeito resultante seria um elevado gasto energético para bombear o  $\text{NH}_4^+$  para fora da célula. Conforme esses autores, aproximadamente 80% do  $\text{NH}_4^+$  absorvido pode sofrer efluxo por esse processo e o elevado consumo de ATP resultante, aumenta muito a respiração nas raízes, determinando redução no seu crescimento.

Nas duas cultivares, o tratamento com maior proporção de nitrato apresentou a maior relação raiz/parte aérea (Tabela 2). Isso porque, além de estar sob influência de uma menor concentração de amônio, o  $\text{NO}_3^-$  é apontado como sinalizador para expressão de genes relacionados à formação de raízes (Smet et al., 2006), à absorção e assimilação de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  e à redução de  $\text{NO}_3^-$  (Forde, 2002). A presença de nitrato também é importante para manter o balanço de cargas na célula, principalmente relacionado à absorção de cátions, evitando a despolarização da membrana (Wang et al., 1993). Além do efeito do amônio e do nitrato no desenvolvimento das raízes, deve-se considerar o efeito sobre a parte aérea. Neste caso, a menor produção de biomassa da parte aérea no tratamento com maior proporção de nitrato (25:75) contribuiu para



e elevar a relação (Tabela 2). Para Britto & Kronzucker (2002) e Kronzucker et al. (2001), além do gasto energético resultante da alocação de fotoassimilados, a inibição do desenvolvimento da parte aérea também está relacionada ao maior gasto energético requerido para assimilação do  $\text{NO}_3^-$  (12 ATPs) comparado ao  $\text{NH}_4^+$  (2 ATPs).

### **3.1.6.2. Distribuição e comprimento de raízes**

As cultivares apresentaram um padrão semelhante de distribuição de raízes entre os tratamentos nas profundidades avaliadas (Tabela 3). De modo geral, as raízes se desenvolveram basicamente na camada de 0-10 cm, perfazendo em torno de 70% para a IRGA 417 e acima de 85% para a Sasanishiki. A cultivar IRGA 417 apresentou maior aprofundamento do sistema radicular, chegando até 20 cm, ao contrário da Sasanishiki, que ficou restrita à camada de 15 cm (Tabela 3). Embora a avaliação compreenda um período de crescimento em que o sistema radicular não está totalmente desenvolvido, o comportamento indica um desenvolvimento superficial de raízes para ambas as cultivares. Comportamento semelhante também foi observado por Abichequer (2004), ao testar cultivares de arroz em solução nutritiva e em solo. De acordo com Lopes et al. (1994), o desenvolvimento do sistema radicular do arroz é muito afetado pelo regime de água e pelas condições do solo. Antes da inundação, o arroz tende a aprofundar o sistema radicular, principalmente em busca de água e, após a inundação, ocorre um desenvolvimento superficial, principalmente devido à redução nos níveis de oxigênio em profundidade e pelos produtos da redução do solo.

Para o comprimento total de raízes, houve diferença entre as cultivares em cada tratamento, sendo a IRGA 417 superior à Sasanishiki (Tabela 3). Entre os tratamentos, não houve diferença de comprimento de raízes para a cultivar Sasanishiki, no entanto, para a IRGA 417, o tratamento  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$  apresentou um comprimento de raízes 47% e 30% superior em relação aos tratamentos  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  25:75  $\text{NO}_3^-$ , respectivamente.

**Tabela 3** - Distribuição do sistema radicular de cultivares de arroz em função do suprimento combinado de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva

Camadas (cm)	Proporções		
	$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$
Comprimento (m)			
----- IRGA 417 -----			
0-5	9,2 <sup>1</sup> (27) <sup>2</sup>	13,2 (24)	11,9 (30)
5-10	14,9 (43)	23,1 (42)	16,9 (43)
10-15	9,1 (26)	16,0 (29)	10,0 (25)
15-20	1,4 (4)	2,5 (5)	0,7 (2)
Total	34,6 bA <sup>3</sup>	54,8 aA	39,4 bA
----- Sasanishiki -----			
-			
0-5	11,9 (39)	13,6 (46)	13,1 (52)
5-10	14,4 (47)	12,2 (42)	9,5 (38)
10-15	4,1 (14)	3,6 (12)	2,7 (11)
15-20	0,0	0,0	0,0
Total	30,4 aA	29,4 aB	25,3 aB

<sup>1</sup> Valores correspondentes ao comprimento das raízes em metros em cada profundidade;

<sup>2</sup> Valores correspondentes aos percentuais de raízes em cada profundidade;

<sup>3</sup> Letras minúsculas comparam tratamentos e letras maiúsculas comparam cultivares pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

O sistema radicular do arroz que se desenvolve nas camadas superficiais é composto basicamente por raízes finas secundárias, terciárias, etc, o que aumenta substancialmente sua área superficial e seu comprimento, contribuindo para a maior absorção de nutrientes (Lopes et al., 1994). O conhecimento do comportamento da distribuição e/ou extensão do sistema radicular de cultivares de arroz dá suporte para estudos sobre o manejo de aplicação de adubos e corretivos, principalmente em relação à camada de solo explorado, diferentemente do manejo adotado em solos com culturas de sequeiro onde ocorre maior aprofundamento. O desenvolvimento superficial de raízes de arroz pode influenciar a absorção de nutrientes, principalmente de N, visto que as adubações de cobertura são feitas em superfície. Neste caso, é importante considerar que, em condições de cultivo a campo, existe uma fina camada superficial do solo alagado oxidada, onde ocorre o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, entre eles, os nitrificadores (Ponnamperuma, 1972).

Desta forma, a nitrificação resultante de toda área superficial da lavoura pode ser importante fonte de  $\text{NO}_3^-$  para as raízes superficiais do arroz, impedindo que o nitrato alcance as camadas reduzidas do solo e, conseqüentemente, seja desnitrificado.

### **3.1.6.3. Nutrientes na biomassa**

A cultivar IRGA 417 apresentou maior teor de nitrogênio na biomassa da parte aérea com o suprimento combinado de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 4). Já para a cultivar Sasanishiki, o tratamento  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  propiciou maior teor de N parte aérea em relação aos demais. Ambas as cultivares não apresentaram diferenças no teor de N na raiz (Tabela 4). Entre elas, a IRGA 417 apresentou maior teor de N no tecido da parte aérea do que a Sasanishiki, enquanto que nas raízes, a Sasanishiki foi superior. O maior teor de N na parte aérea com o suprimento combinado, analisado juntamente com a intensidade dos sintomas de toxidez apresentados em cada tratamento, indica que a presença de nitrato é determinante para o desenvolvimento do arroz. Desta forma, como no solo alagado ocorre aumento da concentração de amônio e o arroz se desenvolve normalmente, é possível que a nitrificação na rizosfera e/ou na superfície do solo seja responsável por fornecer uma quantidade de nitrato adequada para promover um desenvolvimento normal da planta e evitar a toxicidade do amônio, conforme sugerem Britto & Kronzucker (2002), Guy & Kirk (2003), Kronzucker et al. (2000), Duan et al. (2006) e Duan et al. (2007).

Era de se esperar que houvesse uma redução na concentração dos cátions  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  nos tratamentos com maiores percentuais de amônio, devido à competição por sítios catiônicos menos seletivos na membrana plasmática (Holldampf & Barker, 1993); Speer & Kaiser, 1994); Troelstra et al., 1995). Entretanto, nas condições deste experimento, não foi observado esse comportamento de maneira clara. Para a absorção de potássio, não houve diferença entre os tratamentos na cultivar IRGA 417, entretanto, para a Sasanishiki, as plantas apresentaram maior teor de  $\text{K}^+$  na parte aérea nos tratamentos  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  25:75  $\text{NO}_3^-$  e menor teor nas raízes no tratamento  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  em relação aos demais tratamentos (Tabela 4).

Entre as cultivares, não houve diferença na absorção de  $K^+$ , exceto no translocado para a parte aérea no tratamento  $NH_4^+$  25:75  $NO_3^-$  (Tabela 4). O teor de cálcio diminuiu no tecido da parte aérea das duas cultivares e nas raízes da IRGA 417, na medida em que a proporção de amônio aumentou, indicando que a absorção de cálcio é reduzida na presença de  $NH_4^+$ . Para o magnésio, somente foi observado um teor mais elevado no tratamento  $NH_4^+$  25:75  $NO_3^-$  no tecido da parte aérea (Tabela 4). Para a Sasanishiki, não houve diferenças entre os tratamentos para os teores de cátions no tecido da raiz. Este comportamento está de acordo com a suposição de que o  $NH_4^+$  ocupe, em parte, os canais de transporte de baixa afinidade (LATs), como é o caso do cálcio (Tabela 4), no entanto, este comportamento não ficou claro para potássio e para o magnésio, que, ao contrário do cálcio, são normalmente absorvidos contra um gradiente de concentração (Epstein & Bloom, 2006).

**Tabela 4** - Nutrientes na biomassa de cultivares de arroz em função do suprimento combinado de  $NH_4^+$  e  $NO_3^-$  na solução nutritiva

Proporções	Parte aérea		Raiz		Total absorvido	
	IRGA 417	Sasanishiki	IRGA 417	Sasanishiki	IRGA 417	Sasanishiki
	----- N g kg <sup>-1</sup> -----				----- N mg vaso <sup>-1</sup> -----	
$NH_4^+$ 100:0 $NO_3^-$	43,05 b <sup>1</sup> A <sup>2</sup>	41,48 ab B	16,10 a B	19,19 a A	70,62 bA	47,40 bB
$NH_4^+$ 75:25 $NO_3^-$	46,14 a A	43,28 a B	18,26 a B	21,00 a A	116,99 aA	66,54 aB
$NH_4^+$ 25:75 $NO_3^-$	45,97 a A	39,78 b B	17,50 a A	19,66 a A	85,18 bA	50,54 bB
	----- K <sup>+</sup> g kg <sup>-1</sup> -----				----- K <sup>+</sup> mg vaso <sup>-1</sup> -----	
$NH_4^+$ 100:0 $NO_3^-$	47,44 a A	47,26 a A	12,61 a A	13,59 b A	75,82 bA	51,40 aB
$NH_4^+$ 75:25 $NO_3^-$	47,62 a A	45,25 ab A	15,34 a A	20,64 a A	118,17 aA	69,33 aB
$NH_4^+$ 25:75 $NO_3^-$	50,54 a A	42,88 b B	13,34 a A	19,38 ab A	91,04 bA	53,83 aB
	----- Ca <sup>+2</sup> g kg <sup>-1</sup> -----				----- Ca <sup>+2</sup> mg vaso <sup>-1</sup> -----	
$NH_4^+$ 100:0 $NO_3^-$	1,87 c A	1,82 b A	0,21 b A	0,06 a A	2,87 bA	1,82 aA
$NH_4^+$ 75:25 $NO_3^-$	2,34 b A	2,21 ab A	0,32 ab A	0,08 a A	5,56 aA	3,07 aB
$NH_4^+$ 25:75 $NO_3^-$	3,18 a A	2,53 a B	0,61 a A	0,22 a B	5,71 aA	2,82 aB
	----- Mg <sup>+2</sup> g kg <sup>-1</sup> -----				----- Mg <sup>+2</sup> mg vaso <sup>-1</sup> -----	
$NH_4^+$ 100:0 $NO_3^-$	4,99 abA	4,75 a A	0,90 a A	0,79 a A	7,79 aA	4,96 aA
$NH_4^+$ 75:25 $NO_3^-$	4,13 b A	4,55 a A	1,07 a A	0,75 a B	10,27 aA	6,55 aA
$NH_4^+$ 25:75 $NO_3^-$	5,57 a A	4,12 a B	1,04 a A	0,83 a A	9,91 aA	4,78 aB

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ );

<sup>2</sup> Médias seguidas por letras maiúsculas iguais nas linhas não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

Considerando o total absorvido do nutriente em função da biomassa total produzida e o seu teor no tecido vegetal, o estudo indica que as plantas supridas com amônio e nitrato de forma combinada tiveram maior desenvolvimento e, conseqüentemente, maior aproveitamento do N (Tabela 4),

indicando claramente maior eficiência de absorção em relação às plantas em que o N foi fornecido isoladamente na forma de amônio. A cultivar IRGA 417 apresentou também maior absorção total de  $K^+$  e  $Ca^{+2}$  com o suprimento combinado, enquanto que, para a Sasanishiki, não houve diferença entre o total absorvido dos nutrientes, indicando variação entre a exigência nutricional das plantas (Tabela 4).

A importância de se considerar a absorção total dos nutrientes permite concluir com mais segurança sobre o efeito do suprimento combinado sobre o desenvolvimento das plantas, ao contrário de se considerar somente a concentração do elemento no tecido como índice de eficiência de absorção. Nesse caso, a exigência nutricional de diferentes cultivares poderia ser considerada no manejo da fertilidade do solo.

### **3.1.7. Conclusões**

1 - O suprimento combinado de amônio e nitrato proporciona maior produção de biomassa de parte aérea e de raízes em relação ao amônio suprido isoladamente, sendo a proporção  $NH_4^+$  75:25  $NO_3^-$  a mais eficiente entre as testadas;

2- A toxicidade ao amônio é reduzida na medida em que aumenta a proporção de nitrato;

3 – O sistema radicular do arroz se desenvolve basicamente na camada de 0-10 cm, mostrando uma distribuição superficial das cultivares testadas;

4 – O amônio reduziu os teores de cálcio no tecido, porém sem efeito sobre o magnésio e potássio;

5 – A absorção total de nutrientes é influenciada pelo amônio e pelo contraste genético das cultivares, mostrando variação na eficiência de absorção de nutrientes.

## **3.2. Experimento 2 - Suprimento combinado de amônio e nitrato no desenvolvimento e absorção de nutrientes pelo arroz<sup>(1)</sup>**

### **3.2.1. Introdução**

O nitrogênio é um dos nutrientes que mais tem recebido destaque na pesquisa em nutrição de plantas nas últimas décadas. Devido à instabilidade das suas formas químicas nos ambientes naturais e cultivados, basicamente mediadas pela ação de microrganismos, os resultados de estudos sobre o fornecimento, a absorção, o transporte e a assimilação de N são, em alguns casos, conflitantes, gerando dificuldades para o esclarecimento de mecanismos e processos metabólicos ao qual faz parte. Um dos principais entraves, é a dificuldade de se manter o controle absoluto sobre as formas e concentrações de N no ambiente em estudo, considerando que as transformações resultam em perdas, normalmente inevitáveis e consideráveis quantitativamente.

De maneira geral, se admite que as principais formas de N nos ambientes agrícolas para as plantas são o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) as quais coexistem sob variadas relações e concentrações (Britto & Kronzucker, 2005). Embora o íon amônio seja considerada a forma dominante de N e seu estado de oxidação elimina a necessidade de redução na célula para ser assimilado. Em baixas concentrações (micromolar), o amônio pode ser uma fonte adequada de nitrogênio para as espécies de plantas, porém, em maiores

---

<sup>(1)</sup> Trabalho aceito para publicação na Revista Brasileira de Ciência do Solo.

concentrações (milimolar), a sua presença pode causar problemas de toxidez na maioria das plantas, principalmente quando administrado como fonte isolada de N (Gerendas et al 1997), podendo, em casos severos, levá-las à morte (Gigon & Rorison, 1972); Britto & Kronzucker, 2002; Kronzucker et al., 2000). De acordo com Wang et al., (1993); Kronzucker et al., (2001); Britto & Kronzucker (2002) e Kronzucker et al., (2000), a toxicidade do  $\text{NH}_4^+$  é variável entre espécies de plantas, podendo ser tolerado por algumas, como tem sido atribuído à cultura do arroz. No entanto, mesmo espécies tolerantes podem apresentar sintomas de toxidez (Britto & Kronzucker, 2002).

Em áreas cultivadas com arroz alagado, o ambiente anaeróbio e quimicamente reduzido do solo favorece a elevação da concentração do íon  $\text{NH}_4^+$ , tornando-se uma forma estável e, desta forma, considerada a principal forma de nitrogênio para o arroz irrigado (Wang et al., 1993 e Kronzucker et al., 2000). Por outro lado, o nitrato formado nas zonas aeróbias, quando transportado para o ambiente anaeróbio, é rapidamente convertido para as formas voláteis ( $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2\text{O}$  e  $\text{N}_2$ ), devido à sua instabilidade, e perdido para a atmosfera, sendo neste caso, considerado por muitos, uma fonte não importante de nitrogênio para o arroz. Entretanto, é sabido de longa data, que no arroz cultivado sob alagamento, o  $\text{O}_2$  transportado via aerênquima até às raízes é, em parte, liberado na rizosfera, criando condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos aeróbios, dentre eles, os nitrificadores que transformam o  $\text{NH}_4^+$  em  $\text{NO}_3^-$ . Esta transformação sugere que esse possa ser um mecanismo responsável por reduzir a quantidade de amônio absorvido, evitando a sua toxidez e, ainda, fornecer as duas formas de nitrogênio para a planta (Kronzucker et al., 2000, Briones et al., 2003; Kirk & Kronzucker, 2005 e Duan et al., 2006). Porém, pouco se sabe sobre a intensidade da nitrificação na rizosfera e a proporção entre amônio e nitrato resultante e disponível para a planta. Diversos estudos mostram que o suprimento combinado de amônio e nitrato determina maior aproveitamento do N fornecido, assim como maior desenvolvimento de parte aérea e raízes, quando comparado ao suprimento isolado de amônio ou nitrato em diferentes concentrações (Duan et al., 2006 e Duan et al., 2007), indicando a necessidade da fonte nítrica para garantir um desenvolvimento satisfatório do arroz.

No experimento anterior, foi possível observar o efeito das proporções estudadas sobre o desenvolvimento da planta de arroz. Entretanto, não foi possível concluir sobre a proporção entre amônio e nitrato mais favorável ao desenvolvimento do arroz, devido à utilização de somente três proporções. Ainda, como relatado anteriormente, a elevada intensidade da toxicidade por amônio, mesmo nas proporções contendo nitrato, pode estar relacionada com a concentração usada no experimento. Assim, este trabalho foi conduzido com mudanças nas proporções entre amônio e nitrato, buscando detalhar melhor a resposta das plantas e na concentração de N, além de avaliações adicionais que permitam identificar a resposta da planta quanto à absorção de nutrientes em função da presença de amônio e nitrato em solução.

### **3.2.2. Hipótese**

O suprimento de amônio pode reduzir a absorção de cátions e aumentar o transporte de  $\text{NH}_4^+$  para a parte aérea, podendo afetar o desenvolvimento das plantas.

### **3.2.3. Objetivos**

- Avaliar o efeito das proporções de amônio e de nitrato no rendimento de biomassa da parte aérea e raízes;
- Determinar os teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  translocados na seiva do xilema;
- Avaliar a influência das proporções de amônio e nitrato sobre os teores de N,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  na biomassa vegetal do arroz.

### **3.2.4. Material e métodos**

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – RS) no período de janeiro a fevereiro de 2008.

As unidades experimentais (UEs) foram constituídas de recipientes de polietileno (vasos) com capacidade de 10 litros. Como substrato, foi utilizado



poliestireno cristal granulado, material inerte e de densidade superior a da água.

O experimento foi conduzido em solução nutritiva e os tratamentos constaram das seguintes proporções entre  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ : 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 e 0:100. Os vasos foram dispostos obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, totalizando 15 vasos.

Para compor os tratamentos foram utilizadas as seguintes fontes:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . As concentrações finais de cada solução são apresentadas no Tabela 5.

**Tabela 5** - Concentração da solução nutritiva que compõe as proporções de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$

Nutrientes	Proporções $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ (%)				
	100:0	75:25	50:50	25:75	0:100
	----- mmol L <sup>-1</sup> -----				
N	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
P	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
K	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Ca	2.00	2.00	2.00	2.00	2.25
Mg	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25

A solução contendo micronutrientes foi composta por: Mn - ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (0,0047 mmol L<sup>-1</sup>), Cu - ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (0,0047 mmol L<sup>-1</sup>), Zn ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (0,0015 mmol L<sup>-1</sup>), B - ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) (0,023 mmol L<sup>-1</sup>), Mo - ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (0,00011 mmol L<sup>-1</sup>) e Fe-EDTA (Fe - 0,5 mg L<sup>-1</sup>). O pH das soluções foi ajustado até 6,0 com HCl e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>.

O genótipo de arroz utilizado foi o IRGA 417, cultivar de ciclo precoce, pertencente ao grupo moderno (Indica). As sementes foram previamente embebidas em água durante 24 horas. Cinco sementes foram semeadas diretamente em cada UE, no substrato, contendo somente água destilada. Aos quatro Dias Após a Emergência (DAE) estágio V1 (Counce et al., 2000), foi iniciado o fornecimento da solução nutritiva. Cada UE recebeu 3,0 litros de solução nutritiva. Cinco DAE, momento em que as plantas iniciavam a emissão da terceira folha estágio V2 (Counce et al., 2000), foi realizado o desbaste mantendo-se duas plantas em cada UE. Estas foram mantidas

cobertas com uma lâmina de poliestireno expandido com espessura de 2,5 cm com um orifício central para dar suporte às plantas, evitar a entrada direta de luz e reduzir a evaporação da solução. As soluções foram trocadas seis vezes durante a condução do experimento sob o critério de manter o pH entre 5,5 e 6,0 ou quando houvesse redução no nível de solução causada pela evapotranspiração.

As plantas foram colhidas aos 42 DAE, momento que coincide com o estágio de desenvolvimento V8-V9 (Counce, 2000). As plantas foram seccionadas aproximadamente 3,0 cm acima da base, separando-se a parte aérea. Os 3,0 cm restantes de colmo foram externamente lavados com água deionizada e secas com papel absorvente, de onde, após alguns minutos houve a ascensão da seiva do xilema. Dos diversos afilhos foi coletada a seiva do xilema com auxílio de seringas até obter um volume suficiente para análise (~ 1,0 mL). As amostras de xilema foram transferidas para tubos do tipo “ependorf” e congeladas. A composição do xilema foi avaliada por uma análise dos cátions  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e do ânion  $\text{NO}_3^-$  pelo método analítico de separação por cromatografia iônica, em um cromatógrafo DIONEX, modelo DX-120 no modo aberto. As condições desta análise foram: a) Cátions: amônio, potássio, cálcio e magnésio foram quantificados com coluna S16 (5 x 250 mm) e pré-coluna G 16 (5 x 50 mm), tendo como eluente solução aquosa de ácido sulfúrico na concentração de 25,0 mmol L<sup>-1</sup>, com fluxo: 1,09 mL min<sup>-1</sup>. b) O ânion nitrato foi quantificado com uma coluna S22 (4 x 250 mm) e pré-coluna G22 (4 x 50 mm), tendo como eluente solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , na concentração de 3,5 /1,0 mmol L<sup>-1</sup>, com fluxo de 1,06 mL min<sup>-1</sup>.

Após a coleta, cortou-se o restante dos colmos até a base da planta, que foram acrescidos na determinação da biomassa da parte aérea. A solução nutritiva restante foi drenada e as raízes retiradas e lavadas em água destilada. A parte aérea e as raízes foram secas em estufa de ar forçado a 60°C até peso constante, para determinação da matéria seca. As amostras de parte aérea e de raízes foram moídas em micromoinho e submetidas à digestão ácida para posterior determinação dos teores de N,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  (Tedesco et al., 1995).

### **3.2.5. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise da variância ( $p < 0,05$ ) e, quando significativos, foi feita a comparação entre médias dos tratamentos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

### **3.2.6. Resultados e discussão**

#### **3.2.6.1. Produção de biomassa**

A produção de biomassa da parte aérea, raiz e total diferiu entre as proporções de amônio e nitrato testadas (Tabela 6). O maior rendimento de biomassa de parte aérea foi obtido nas proporções em que o nitrogênio foi fornecido de forma combinada, indicando que a planta de arroz apresenta maior desenvolvimento quando o nitrato é fornecido juntamente com o amônio. Embora não tenha havido diferenças ( $p > 0,05$ ) entre as três proporções em que o N foi fornecido de forma combinada (Tabela 6), as plantas dos tratamentos  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  25:75  $\text{NO}_3^-$  apresentaram sintomas de toxidez, característicos de amônio e nitrato respectivamente. A ausência da variação de rendimento de biomassa de parte aérea nestes tratamentos ocorreu porque os sintomas de toxidez aparecem primeiramente nas folhas mais velhas, após estarem totalmente desenvolvidas, evoluindo gradativamente para as demais. Isto se justifica, porque a toxidez por amônio tem relação direta com o efeito acumulativo desses íons na célula (Wang et al., 1994; Britto et al., 2001).

**Tabela 6** - Biomassa da parte aérea, raízes, total e relação raiz/parte área de arroz em função de proporções de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva

Tratamentos	Parte aérea	Raiz	Total	Raiz/Parte aérea
	----- g vaso <sup>-1</sup> -----			
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	9,81 b <sup>1</sup>	0,95 c	10,76 b	0,10 d
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	15,18 a	2,06 b	17,24 a	0,14 cd
$\text{NH}_4^+$ 50:50 $\text{NO}_3^-$	15,11 a	2,43 b	17,54 a	0,16 c
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	17,09 a	3,50 a	20,59 a	0,20 b
$\text{NH}_4^+$ 0:100 $\text{NO}_3^-$	6,71 b	1,72 bc	8,66 b	0,27 a
CV %	18,57	20,76	18,22	12,72

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

Já a toxidez por nitrato está associada ao elevado gasto energético necessário para sua assimilação, síntese de fotoassimilados e sua translocação para as raízes, causando inibição de crescimento (Reddy & Menary, 1990). As menores produções de biomassa nas proporções  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  0:100  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 6) indica a resposta da planta em relação ao efeito da severidade da toxidez causada pelo amônio e pelo nitrato respectivamente, quando esses íons são supridos isoladamente. Já na proporção  $\text{NH}_4^+$  50:50  $\text{NO}_3^-$ , as plantas se desenvolveram normalmente, sem qualquer sintoma visível de toxidez, indicando que o balanço entre as duas fontes de N foi a proporção mais favorável ao desenvolvimento do arroz, sem causar aparentes danos fisiológicos à planta.

O sistema radicular apresentou maior desenvolvimento quando submetido à proporção  $\text{NH}_4^+$  25:75  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 6). À medida que aumenta a proporção de nitrato, há uma tendência de aumento na produção de biomassa de raiz até o tratamento  $\text{NH}_4^+$  25:75  $\text{NO}_3^-$  porém, com redução acentuada no tratamento  $\text{NH}_4^+$  0:100  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 6). A variação do crescimento das raízes entre os tratamentos pode ser atribuída ao efeito do íon nitrato. Além de fonte de N, o íon nitrato, quando percebido pela raiz, atua como sinalizador sobre a expressão de genes relacionados ao transporte de nitrato na membrana celular, comumente denominados de NRTS (Nitrate Transporters) e um outro sinal é responsável por ativar a alocação de fotoassimilados da parte aérea

para as raízes, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular (Forde, 2002).

O baixo rendimento de matéria seca no tratamento  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 6) pode ser atribuído à severa toxidez por amônio, no qual as plantas tiveram seu desenvolvimento prejudicado. Nesse tratamento, as plantas apresentavam sintomas de toxidez visíveis aos 27 DAE. Os sintomas se manifestaram, em primeiro lugar, nas folhas mais velhas, na forma de manchas cloróticas, evoluindo para a necrose da folha, da bainha para o centro. Como a toxidez se manifesta somente nas folhas mais velhas, que estão totalmente desenvolvidas, sugere-se que a entrada contínua de amônio por transportadores de baixa afinidade, de maneira passiva, afeta o controle de entrada do  $\text{NH}_4^+$  na célula, causando seu acúmulo (Wang et al., 1994; Kronzucker et al., 1999) e, conseqüentemente, uma série de distúrbios fisiológicos e a morte das células (Britto & Kronzucker, 2002; Britto & Kronzucker, 2005). Na proporção  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$ , os sintomas se manifestaram com baixa intensidade e somente aos 35 DAE (Tabela 6). O comportamento acumulativo desse elemento e sua relação com a toxidez também foram relatados por Britto et al. (2001), que encontraram concentrações de amônio superiores a  $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$  no citosol de células de cevada e de arroz quando submetidas a concentrações externas de  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ . Sintomas semelhantes também foram observados por Gigon & Rorison (1972), Britto & Kronzucker (2002) e Kronzucker et al. (2000) em diversas culturas. Embora possam ser encontradas concentrações de até  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$  em solos cultivados (Wolt, 1994), a concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de N utilizada no experimento foi suficiente para causar toxidez nos tratamentos  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$ .

Cabe salientar que no cultivo em solução nutritiva os microrganismos não estão presentes, principalmente os responsáveis pelas transformações das formas nitrogenadas no ambiente de solo alagado, sugerindo que o amônio permaneça na sua forma e não seja transformado em nitrato, caracterizando a toxidez mesmo na concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Ainda, como a solução era trocada constantemente, a concentração de amônio era mantida praticamente constante durante todo o período, ao contrário do

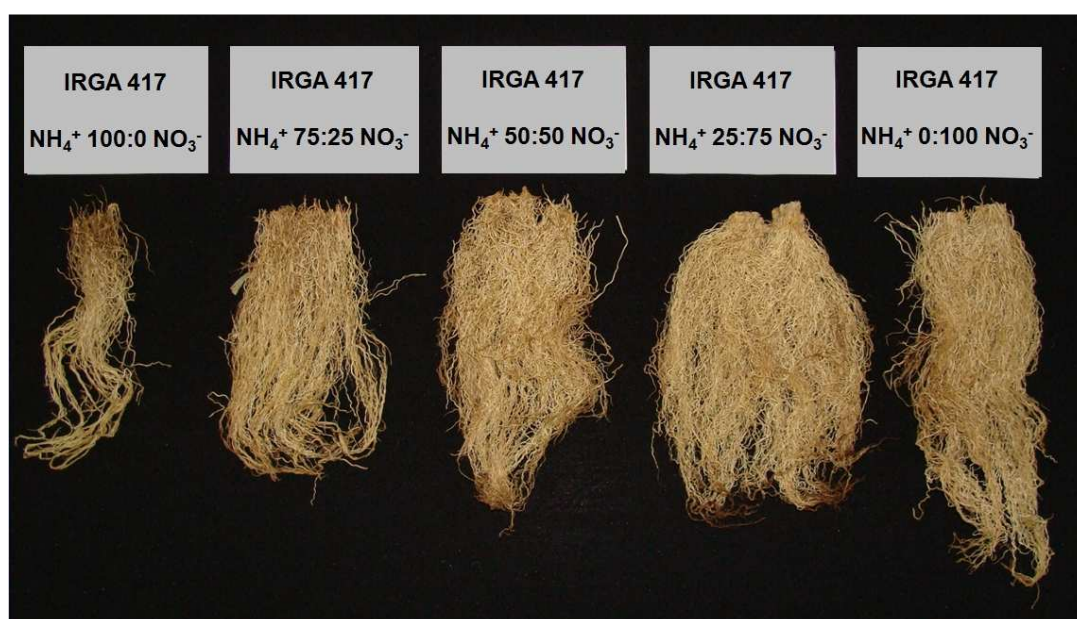
que acontece no campo, onde a disponibilidade de N sofre flutuações durante o ciclo da cultura e períodos entre aplicações de fertilizantes.

A variação do desenvolvimento da parte aérea e das raízes em função do fornecimento de amônio e nitrato permite criar um índice comumente denominado de relação raiz/parte aérea. Este índice é útil para avaliar o efeito dos íons amônio e nitrato nos processos metabólicos relacionados à assimilação, translocação de fotoassimilados e/ou respostas a distúrbios fisiológicos na planta (Haynes & Goh, 1978). À medida que aumentou a proporção de nitrato entre os tratamentos, houve um aumento correspondente na relação raiz/parte aérea (Tabela 6). Entretanto, mesmo com a maior relação na proporção  $\text{NH}_4^+$  0:100  $\text{NO}_3^-$ , deve-se considerar que houve também uma redução na produção de biomassa de parte aérea e raízes nesse tratamento em relação às proporções em que o N foi fornecido de forma combinada (Tabela 6).

De maneira geral, a variação na relação raiz/parte aérea foi basicamente dependente do desenvolvimento do sistema radicular, o que pode ser atribuído à presença do nitrato. De acordo com Forde (2002), o nitrato atua sobre a expressão gênica da planta, onde se inclui o estímulo sobre o desenvolvimento de raízes (Smet et al., 2006) e na formação de transportadores de nitrato na membrana plasmática das células de raízes, aumentando a absorção desse íon (Forde, 2002). O desenvolvimento de raízes determina que esqueletos carbônicos oriundos da fotossíntese sejam translocados da parte aérea para as raízes, causando um desequilíbrio no balanço energético da planta (Forde, 2002). O aumento da absorção de  $\text{NO}_3^-$ , embora desejável, está associado a um intenso gasto energético para assimilação do íon, que é de 12 ATPs comparados aos 2 ATPs necessários para assimilar o  $\text{NH}_4^+$  (Britto & Kronzucker, 2002; Kronzucker et al., 2001). Desta forma, o gasto energético necessário para translocação e assimilação determina um menor desenvolvimento da parte aérea em relação ao das raízes, refletindo-se na relação raiz/parte aérea. O efeito dos tratamentos sobre o desenvolvimento das raízes é visualizado na Figura 1.

Outro efeito associado à redução do crescimento da parte aérea está associado à excessiva entrada de amônio nas células da raiz. Nos tratamentos  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$ , onde foi observada toxidez

pelo íon  $\text{NH}_4^+$ , houve, também, menor produção de biomassa de parte aérea, influenciando a relação raiz/parte aérea ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6). Considerando que a assimilação do amônio ocorra principalmente nas raízes, a elevação da sua concentração nas células aumenta a demanda por esqueletos de carbono oriundos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Barta, 1976; Oaks, 1992). Desta forma, além dos problemas de toxidez já discutidos anteriormente, a assimilação de grandes quantidades de amônio em amidas e aminoácidos na raiz e sua translocação para a parte aérea determina elevado gasto energético para a planta, fazendo com que haja inibição do desenvolvimento da parte aérea. De acordo com Schjoerring et al. (2002), o transporte eficiente de carboidratos para as raízes pode favorecer a metabolização do amônio, evitando o transporte para a parte aérea e, assim, atuar como mecanismo de prevenção à toxicidade. Kronzucker et al. (2000) e Britto et al. (2001) propuseram um mecanismo de efluxo do amônio para fora da célula, denominado de ciclagem fútil. O efeito resultante desse efluxo seria um elevado gasto energético necessário para bombear o  $\text{NH}_4^+$  para fora da célula. Conforme esses autores, aproximadamente 80% do  $\text{NH}_4^+$  absorvido pode sofrer efluxo por esse processo e o elevado consumo de ATP aumenta a respiração nas raízes, determinando redução no seu crescimento.



**Figura 1** - Desenvolvimento do sistema radicular do arroz submetido ao suprimento combinado de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  em solução nutritiva.

### 3.2.6.2. *Nutrientes na biomassa*

Os teores de N e  $K^+$  no tecido da parte aérea não foram influenciados pelas proporções entre amônio e nitrato (Tabela 7). Nas raízes, houve diferença nos seus teores, sendo o tratamento  $NH_4^+$  50:50  $NO_3^-$  superior aos demais (Tabela 7). No entanto, não houve uma tendência clara em relação aos tratamentos. Por outro lado, os teores de cálcio e de magnésio na biomassa da parte aérea e da raiz aumentaram à medida que a proporção de amônio na solução decresceu (Tabela 7), indicando que a absorção desses cátions foi afetada pela presença do amônio. Este comportamento tem sido atribuído ao tipo de transportador envolvido na absorção desses cátions, visto que o  $K^+$ , o  $Ca^{+2}$  e o  $Mg^{+2}$  são preferencialmente absorvidos por transportadores do tipo canais, de baixa afinidade (LATS) ou menor seletividade. Assim, devido à similaridade de algumas propriedades físico-químicas, como carga e diâmetro do íon hidratado, o amônio é capaz de ocupar os sítios de absorção de  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$ , afetando a sua absorção e, conseqüentemente, determina a entrada de  $NH_4^+$  em quantidades superiores à capacidade de assimilação das raízes. A redução da absorção de  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  na presença de  $NH_4^+$  pode acarretar a deficiência desses elementos e assim, afetar o desenvolvimento da planta (Troelstra et al., 1995; Kirkby, 1968; Dibb & Thompson, 1985; Wang et al., 1996).

Considerando o total de nutrientes absorvidos em relação à biomassa produzida, o estudo indica que as plantas supridas com amônio e nitrato de forma combinada tiveram maior aproveitamento de N,  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  (Tabela 7). Ao se considerar a absorção total dos nutrientes, pode-se concluir, com maior segurança, sobre o efeito dos tratamentos no desenvolvimento das plantas e na eficiência de absorção de nutrientes, ao invés de se considerar somente a concentração do nutriente no tecido. A dificuldade dessa interpretação é reforçada pelo fato de que a variação no crescimento da planta, juntamente com o armazenamento de nutrientes nos vacúolos das células, determinam a diluição do nutriente no tecido, gerando dúvidas sobre a sua real utilização em nível metabólico.



**Tabela 7** - Nutrientes na biomassa de arroz em função do suprimento combinado de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva

Tratamentos	Parte Aérea	Raiz	Total absorvido
	----- N g kg <sup>-1</sup> -----		N mg vaso <sup>-1</sup>
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	38,8 <sup>ns (1)</sup>	27,2 c	405 b
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	41,3	31,2 ab	692 a
$\text{NH}_4^+$ 50:50 $\text{NO}_3^-$	41,4	31,4 a	697 a
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	41,1	19,6 d	770 a
$\text{NH}_4^+$ 0:100 $\text{NO}_3^-$	37,5	28,5 bc	303 b
CV %	5,73	5,40	15,1
	----- K <sup>+</sup> g kg <sup>-1</sup> -----		K <sup>+</sup> mg vaso <sup>-1</sup>
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	44,4 <sup>ns</sup>	23,1 c	459 b
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	45,3	31,3 ab	753 a
$\text{NH}_4^+$ 50:50 $\text{NO}_3^-$	44,8	37,1 a	763 a
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	45,7	18,6 c	841 a
$\text{NH}_4^+$ 0:100 $\text{NO}_3^-$	45,8	30,1 b	369 b
CV %	6,99	12,8	18,6
	----- Ca <sup>+2</sup> g kg <sup>-1</sup> -----		Ca <sup>+2</sup> mg vaso <sup>-1</sup>
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	2,05 d	0,45 c	20,3 c
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	3,08 c	0,98 b	48,7 b
$\text{NH}_4^+$ 50:50 $\text{NO}_3^-$	3,48 c	1,03 b	54,1 b
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	4,33 b	1,20 b	78,5 a
$\text{NH}_4^+$ 0:100 $\text{NO}_3^-$	5,78 a	2,75 a	43,1 b
CV %	10,2	20,9	22,5
	----- Mg <sup>+2</sup> g kg <sup>-1</sup> -----		Mg <sup>+2</sup> mg vaso <sup>-1</sup>
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	4,18 d	0,95 c	41,8 c
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	5,08 c	1,81 ab	80,7 b
$\text{NH}_4^+$ 50:50 $\text{NO}_3^-$	5,27 bc	1,75 b	82,4 b
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	5,85 ab	1,74 b	105, 8 a
$\text{NH}_4^+$ 0:100 $\text{NO}_3^-$	6,05 a	2,17 a	44,8 c
CV %	7,54	12,3	17,0

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ );

<sup>ns</sup> Não significativo.

### 3.2.6.3. Nutrientes na seiva do xilema

A concentração de nitrato no xilema aumentou na medida em que a sua proporção na solução foi aumentando entre os tratamentos (Tabela 8). Ainda que as rotas de assimilação do nitrato sejam altamente reguladas por diferentes mecanismos, o passo mais importante nessa regulação parece ser o processo de influxo na membrana plasmática das células corticais e epidérmicas da raiz (Forde, 2002). O influxo de nitrato é um processo ativo, governado por um gradiente de  $\text{H}^+$  e catalisado por uma combinação de um

sistema de transportadores de alta (HATS) e baixa afinidade (LATS) (Forde, 2002), do tipo simporte, com entrada simultânea de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  e com consumo de ATP (Taiz e Zeiger, 2004). A regulação do influxo é, portanto, dependente da expressão gênica que codifica os transportadores na membrana plasmática, tendo como sinalizador local e de longa distância, o próprio íon  $\text{NO}_3^-$ . Desta forma, a absorção do nitrato, a indução de rotas metabólicas ligadas à sua assimilação e a reprogramação do metabolismo do carbono (Crawford, 1995; Coruzzi & Bush, 2001), ocorrem basicamente em resposta às flutuações na disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no meio externo (Forde, 2002). Isto está de acordo com os resultados deste experimento, no qual, o aumento gradativo da concentração desse íon na seiva do xilema sugere que até a concentração de  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{NO}_3^-$  na solução externa, ocorreu a formação contínua de transportadores para esse íon (Williams & Miller, 2001).

Outro ponto importante no controle da absorção de N está relacionado ao estado nutricional da planta, o que caracteriza um efeito de *feedback* (Forde, 2002). No entanto, neste estudo, a absorção de  $\text{NO}_3^-$  não foi eficientemente regulada a ponto de evitar a sua entrada em elevadas quantidades, resultando na translocação de níveis prejudiciais ao desenvolvimento das plantas, a partir da proporção  $\text{NH}_4^+ 25:75 \text{ NO}_3^-$ . O gasto energético necessário para realizar a absorção, a síntese e o transporte de assimilados da parte aérea para as raízes, como também o consumo de ATP necessário para assimilar o  $\text{NO}_3^-$ , são as principais razões pela qual o desenvolvimento da planta é afetado quando submetida a elevadas concentrações de nitrato no meio (Forde, 2002; Britto & Kronzucker, 2005).

O conteúdo de amônio na seiva do xilema não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre as proporções de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , mesmo havendo pequenas variações entre elas (Tabela 8). O efeito dessas variações pode ser justificado pela influência da toxidez por amônio sobre o desenvolvimento das plantas nas proporções  $\text{NH}_4^+ 100:0 \text{ NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+ 75:25 \text{ NO}_3^-$ . A diferença da concentração de amônio no xilema nas proporções  $\text{NH}_4^+ 100:0 \text{ NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+ 75:25 \text{ NO}_3^-$  em relação à proporção  $\text{NH}_4^+ 50:50 \text{ NO}_3^-$ , onde não foi observada toxidez, foi de  $6,29$  e  $4,34 \text{ mmol L}^{-1}$  respectivamente (Tabela 8), indicando que a partir de  $28,76 \text{ mmol L}^{-1}$  de amônio, existe a possibilidade da concentração ser elevada

o suficiente para que ocorra transporte excessivo até a parte aérea e seja caracterizada a toxidez.

**Tabela 8** - Nutrientes na seiva do xilema de arroz em função do suprimento combinado de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução nutritiva

Tratamentos	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{+2}$	$\text{Mg}^{+2}$
	----- mmol L <sup>-1</sup> -----				
$\text{NH}_4^+$ 100:0 $\text{NO}_3^-$	0,38 c <sup>1</sup>	33,1 <sup>ns</sup>	21,3 b	0,44 d	2,79 b
$\text{NH}_4^+$ 75:25 $\text{NO}_3^-$	3,85 c	35,0	21,6 b	0,68 c	2,71 b
$\text{NH}_4^+$ 50:50 $\text{NO}_3^-$	95,8 b	28,7	22,1 b	0,68 c	2,72 b
$\text{NH}_4^+$ 25:75 $\text{NO}_3^-$	115,9 b	25,9	27,8 a	1,23 b	4,27 a
$\text{NH}_4^+$ 0:100 $\text{NO}_3^-$	231,9 a	20,7	29,6 a	1,69 a	4,44 a
CV%	18,8	34,5	10,5	11,2	11,9

<sup>1</sup> Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ );

<sup>ns</sup> Não significativo.

Embora as análises de monitoramento da solução nutritiva não tenham detectado amônio na proporção  $\text{NH}_4^+$  0:100  $\text{NO}_3^-$  (dados não apresentados), a concentração de amônio na seiva do xilema nesse tratamento apresentou valores próximos às proporções que continham amônio (Tabela 8). A presença desse íon pode estar relacionada à redução do nitrato nos plastídios de células das raízes, com conseqüente translocação até a parte aérea. De acordo com Forde (2002), embora a maior parte do nitrato seja assimilada na parte aérea das plantas, também é comum a presença da enzima nitrato redutase em plastídios não fotossintéticos de células das raízes.

À medida que a proporção de  $\text{NH}_4^+$  aumentou nos tratamentos, houve uma redução na absorção de  $\text{K}^+$ , de  $\text{Ca}^{+2}$  e de  $\text{Mg}^{+2}$  (Tabela 8), indicando que o amônio afetou a absorção desses cátions, por ocupar os canais transportadores de baixa afinidade. A redução da absorção de  $\text{K}^+$ , de  $\text{Ca}^{+2}$  e de  $\text{Mg}^{+2}$  pelo amônio foi de 28, 280 e 37% respectivamente, quando comparadas as proporções  $\text{NH}_4^+$  0:100  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  100:0  $\text{NO}_3^-$  (Tabela 8). Conforme já discutido anteriormente, a influência negativa do amônio sobre a absorção desses cátions pode levar a deficiências na planta, principalmente considerando a importância de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e de  $\text{Mg}^{+2}$  na regulação de diversos processos metabólicos e na composição de moléculas e tecidos.

Embora se tenha observado problemas de toxidez por amônio e nitrato nas proporções  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  25:75  $\text{NO}_3^-$ , fica evidente que o suprimento combinado de amônio e nitrato proporcionou maior desenvolvimento das plantas do que o amônio ou o nitrato supridos isoladamente, conforme também já observado por Kronzucker et al. (1999) e Duan et al. (2007). Desta forma, pode-se especular que, em condições de cultivo de arroz em solo alagado, ocorra não apenas o aumento da concentração de amônio, como sugerido por Ponnampereuma (1972), mas que as zonas oxidadas sejam responsáveis por favorecer a nitrificação em taxas capazes de fornecer nitrato em quantidades adequadas para a cultura, de forma semelhante à proporção  $\text{NH}_4^+$  50:50  $\text{NO}_3^-$  testada neste trabalho, conforme sugerem Britto & Kronzucker (2002); Kronzucker et al. (2000); Duan et al. (2006) e Duan et al. (2007).

### 3.2.7. Conclusões

1 - O suprimento combinado de amônio e de nitrato proporciona maior produção de biomassa de arroz em relação às fontes supridas isoladamente, indicando que o nitrato é uma fonte importante de N e que o balanço entre as fontes favorece o desenvolvimento do arroz irrigado;

2 - A presença de amônio na concentração de 5,0 e 3,75 mmol L<sup>-1</sup> causa toxidez ao arroz irrigado nas proporções  $\text{NH}_4^+$  100: 0  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  75:25  $\text{NO}_3^-$  e afeta os teores totais de cálcio e magnésio na biomassa, porém não interfere nos teores totais de nitrogênio e potássio.

3 – A análise da seiva do xilema foi eficiente para mostrar que o amônio afeta negativamente a absorção de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e que o efeito é dependente da concentração de amônio no meio.

## **4. CAPÍTULO III - ESTUDO 2 - FORMAÇÃO DE AERÊNQUIMA E SUA RELAÇÃO COM A LIBERAÇÃO DE OXIGÊNIO E OXIDAÇÃO DO FERRO EM RAÍZES DE ARROZ**

### **4.1. Experimento 1 - Avaliação da porosidade e da placa férrica de raízes adventícias de arroz cultivado em hipoxia<sup>(1)</sup>**

#### **4.1.1. Introdução**

Nos solos alagados, a baixa taxa de difusão do O<sub>2</sub> na lâmina de água determina a formação de camadas distintas quanto ao regime de oxigênio no solo. Há uma camada superficial oxidada de alguns milímetros e, abaixo desta, é formado um ambiente com pouco ou nenhum oxigênio molecular (Ponnamperuma, 1972). Para manter o crescimento em ambiente sem oxigênio, as plantas de arroz sofreram adaptações estruturais na parte aérea e nas raízes que as permitem transportar o oxigênio necessário para promover a respiração celular nos pontos de crescimento (Jackson & Armstrong, 1999). Entretanto, o oxigênio transportado até a raiz pode, em parte, se difundir para o solo em virtude do gradiente de O<sub>2</sub> criado entre o solo e o interior da raiz. A

---

<sup>(1)</sup> Trabalho publicado na Revista Brasileira de Ciência do Solo, 34:1763-1769, 2010.

intensidade com que ocorre essa perda é determinada por características da raiz, como o espessamento da parede celular, a região da raiz e o volume de aerênquima (Clark & Harris, 1981; Colmer, 2003; Evans, 2003).

A liberação de oxigênio das raízes para a rizosfera possibilita a oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  para  $\text{Fe}^{+3}$ . Esta oxidação resulta na acumulação de ferro na superfície e nas células da epiderme da raiz (Tanaka et al., 1966) na forma de oxihidróxidos de ferro pouco cristalinizados, comumente denominada de placa férrica (Chen et al., 2006). De acordo com Tanaka et al. (1966) e Chen et al. (1980), a formação da placa férrica é variável entre cultivares de arroz, e até mesmo, entre estádios de desenvolvimento. A determinação da quantidade de ferro oxidado poderia servir como parâmetro para diferenciar cultivares quanto à sua capacidade de transportar e liberar oxigênio para a rizosfera. Entretanto, a facilidade do oxigênio em se difundir através de materiais orgânicos e água, dificulta a criação e/ou manutenção de um ambiente livre de oxigênio molecular quando se trabalha em solução nutritiva com arroz. As técnicas utilizadas para esses estudos não tem sido muito eficientes na exclusão do oxigênio do ambiente radicular, levando a conclusões que nem sempre expressam a situação de uma planta de arroz em solo alagado, principalmente em expressar seu potencial genético para formar aerênquima.

#### **4.1.2. Hipóteses**

- A obtenção de um ambiente com reduzida quantidade de oxigênio (hipoxia) estimula a formação de aerênquima em arroz.
- A determinação da porosidade em raízes e a avaliação da placa férrica podem servir como estimativa da formação do aerênquima.

#### **4.1.3. Objetivo**

Desenvolver uma metodologia original para a cultura do arroz, sem contato direto com o solo alagado, mas que proporcione uma condição de hipoxia semelhante às condições naturais para obter raízes para estudo da placa férrica e estimar a formação de aerênquima.

#### **4.1.4. Material e métodos**

O experimento foi conduzido na Estação Experimental do Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA) (Cachoeirinha – RS) no período de novembro de 2008 a fevereiro de 2009.

##### **4.1.4.1. Obtenção de raízes de arroz em ambiente de hipoxia**

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação, com temperaturas variando entre 20 - 30 °C. A condição de hipoxia foi obtida, explorando a capacidade de difusão do oxigênio através do material plástico vinil em contato externo com solo em processo de redução. Para isso, foram produzidos sacos de vinil com espessura de 0,1mm e dimensões de 30 x 40 cm. As unidades experimentais foram compostas por tanques com capacidade de 50 L. Cada UE recebeu 5 sacos de vinil, os quais foram colocados sobre uma camada de solo de 5,0 cm no fundo da caixa e afastados 10,0 cm entre si. Em cada saco foi colocado um espaçador interno (condutor elétrico 10 mm de diâmetro), com objetivo de manter um espaço adequado para que as raízes se desenvolvessem sem impedimento físico. A caixa foi preenchida com solo (Gleissolo Háplico) (Streck, 2008), deixando a abertura do saco a 10,0 cm acima da superfície (Figura 2). Cada saco recebeu 150 mL de solução nutritiva (Silva & Bohnen, 2001). O solo foi alagado e mantido com uma lâmina de água de 5,0 cm.

Plantas dos genótipos IRGA 423 e IRGA 424 cultivadas no campo até o início do florescimento foram retiradas inteiras do solo e levadas para a casa de vegetação, onde perfilhos uniformes e vigorosos foram separados, tendo todas as raízes cortadas junto ao colo da planta (Figura 3). As plantas foram cuidadosamente lavadas para evitar a contaminação com solo no cultivo de raízes. Para reduzir a taxa de transpiração, 1/3 da lâmina foliar foi removida. Essas plantas foram alocadas nos sacos de vinil, de forma que o colo das mesmas ficasse posicionado na altura da superfície do solo. Cada saco recebeu 12 plantas de cada genótipo. Após um período de sete dias, com novas raízes adventícias formadas, as plantas foram retiradas dos sacos e

levadas imediatamente para o laboratório (Figura 4). A solução nutritiva foi regularmente reposta nos sacos, na medida em que a transpiração reduzia o volume. Análises de monitoramento do oxigênio dissolvido nos sacos durante o período de formação de raízes indicaram uma concentração de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  junto ao colo das raízes (limite inferior de detecção do oxímetro), indicando a eficiência do método em promover um ambiente de hipoxia.



**Figura 2** – Unidade experimental preenchida com um Gleissolo Háplico, contendo os sacos de vinil e as respectivas plantas de arroz com raízes removidas.





**Figura 3** – Plantas de diferentes genótipos de arroz com raízes removidas e preparadas para produção de raízes adventícias em hipoxia.



**Figura 4** – Detalhes da formação de raízes adventícias obtidas em sacos de vinil e em solo alagado sob hipoxia.

#### **4.1.4.2. Placa férrica e porosidade**

No laboratório, foram cortadas sete raízes de cada genótipo em segmentos de 7,0 cm a partir da ponta. As raízes foram fixadas em um suporte de acrílico, colocadas em uma caixa de vidro (20 x 10 x 1,5 cm) e inundadas com nitrogênio ultra puro ( $< 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ ), visando remover o oxigênio. A caixa de vidro foi preenchida com solução do solo (Planossolo Háplico) (Streck, 2008) previamente alagado, apresentando  $\text{pH} = 6,2$  e  $80 \text{ mg L}^{-1}$  de ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) (Figura 5). A solução do solo foi obtida por um sistema composto por um tanque de 50 L preenchido com um Planossolo Háplico em estágio avançado de redução, conforme Nava (1997). As raízes permaneceram na solução do solo por um período de quatro horas, para que o gradiente de oxigênio formado entre o interior da raiz (aerênquima) e a solução do solo, promovesse a difusão do oxigênio molecular para o exterior da raiz. Este tempo de contato foi estabelecido para evitar que a concentração de ferro na solução caísse para níveis muito baixos, dificultado a sua difusão para junto das raízes. A liberação do oxigênio pela raiz e a sua combinação com o  $\text{Fe}^{+2}$  resulta na formação de compostos oxidados de ferro de baixa cristalinidade, formando a placa férrica na superfície da raiz (Figura 5). Após, as raízes foram lavadas e cortadas em segmentos de 2,0 cm a partir da ponta, compondo as amostras de cada região da raiz, que compreendem os segmentos de 0-2; 2-4 e 4-6 cm. Os segmentos foram fotografados e analisados individualmente. A cada segmento foi adicionado 1,0 ml de  $\text{HCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e mantido em repouso por 24 horas, caracterizando cada repetição, num total de 7 repetições para cada segmento e genótipo. As amostras contendo o ferro dissolvido foram determinadas por espectrofotômetro de absorção atômica (Nava & Bohnen, 2002). A partir das imagens digitalizadas, foi calculada a área superficial do segmento com o software SIARCS v. 3.0 que, juntamente com a concentração de ferro na amostra, possibilita calcular a sua distribuição no segmento.

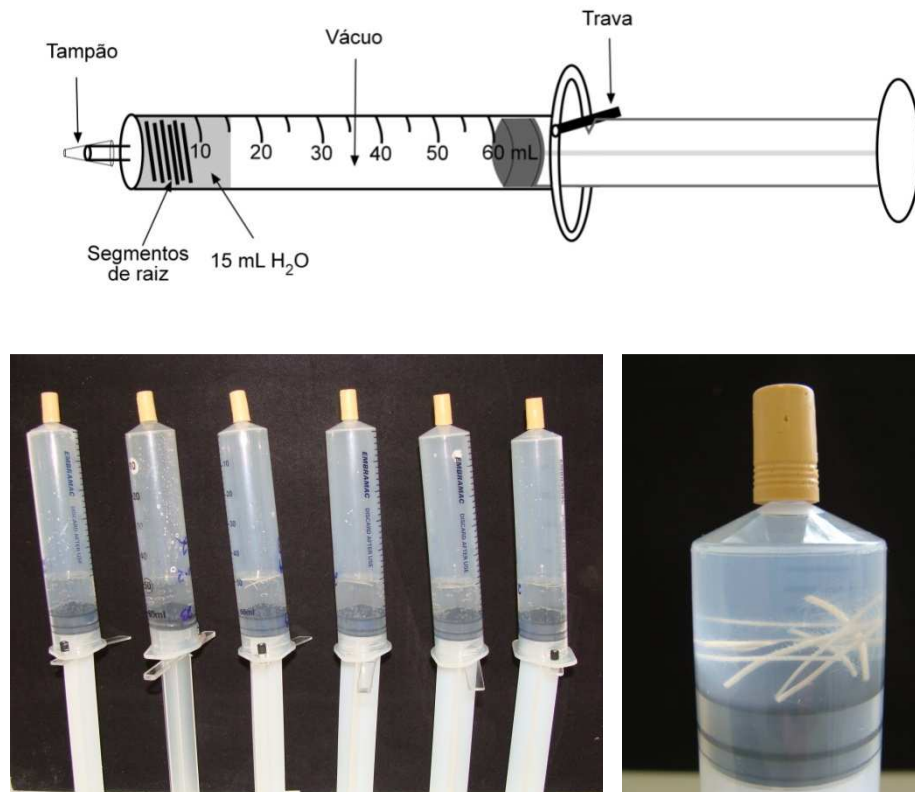


**Figura 5** – Detalhes da caixa de vidro contendo segmentos de raízes imersos em solução do solo com pH = 6,2 e com 80 mg L<sup>-1</sup> de ferro utilizadas para formação da placa férrica.

#### **4.1.4.3. Determinação da porosidade de raízes**

Das plantas usadas para determinação da placa férrica, outro grupo de raízes foi retirado para a avaliação da porosidade. Destas, 30 raízes foram cortadas em segmentos de 0-2; 2-4 e 4-6 cm a partir da ponta, constituindo três repetições por segmento, cada uma contendo 10 segmentos. Cada grupo foi cuidadosamente seco com lenço de papel e pesado. Após, os segmentos foram colocados em uma seringa de plástico de 60 mL, contendo 10 mL de água. O volume da seringa foi reduzido para 10 mL e a entrada da mesma vedada com uma tampa de silicone. O êmbolo foi puxado e travado para manter o vácuo por três minutos para extrair o ar presente na raiz. Após esse tempo, o êmbolo foi solto e mantido por outros três minutos, possibilitando a entrada da água no vácuo criado no interior da raiz. Este ciclo foi repetido até se observar que todos os segmentos se depositavam no fundo da seringa, indicando que os espaços porosos foram completamente preenchidos com água. As raízes foram retiradas da seringa e novamente secas e pesadas. A diferença de peso antes e depois do tratamento com vácuo e entrada de água

foi assumida como sendo a porosidade da raiz, resultando em uma estimativa da magnitude do aerênquima formado em cada segmento ao longo da raiz. Os detalhes das seringas utilizadas para avaliar o espaço poroso de raízes são mostradas na Figura 6.



**Figura 6** - Detalhes das seringas utilizadas para avaliar o espaço poroso de raízes adventícias de arroz irrigado.

#### **4.1.4.4. Teste da metodologia**

Foram usados dois genótipos de arroz (IRGA 423 e IRGA 424), cultivados em um Gleissolo Háplico (Streck, 2008) até o início do florescimento. As plantas foram retiradas do solo e preparadas como descrito anteriormente. A formação de raízes adventícias foi realizada com dez plantas no saco de vinil no solo alagado e dez plantas em solução nutritiva com aeração constante. Após sete dias foram feitas as determinações da placa férrica e da porosidade.

Para avaliar a eficiência do saco de vinil em evitar a contaminação com ferro, foi feito um branco, com a determinação do ferro em raízes retiradas

do saco de vinil, sem exposição à solução do solo. A concentração de ferro na superfície da raiz ficou abaixo dos limites de detecção do aparelho (dados não apresentados), indicando que não houve contaminação por ferro durante o desenvolvimento das raízes adventícias.

#### **4.1.5. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise da variância ( $p < 0,05$ ) e, quando significativos, foi feita a comparação entre médias dos tratamentos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

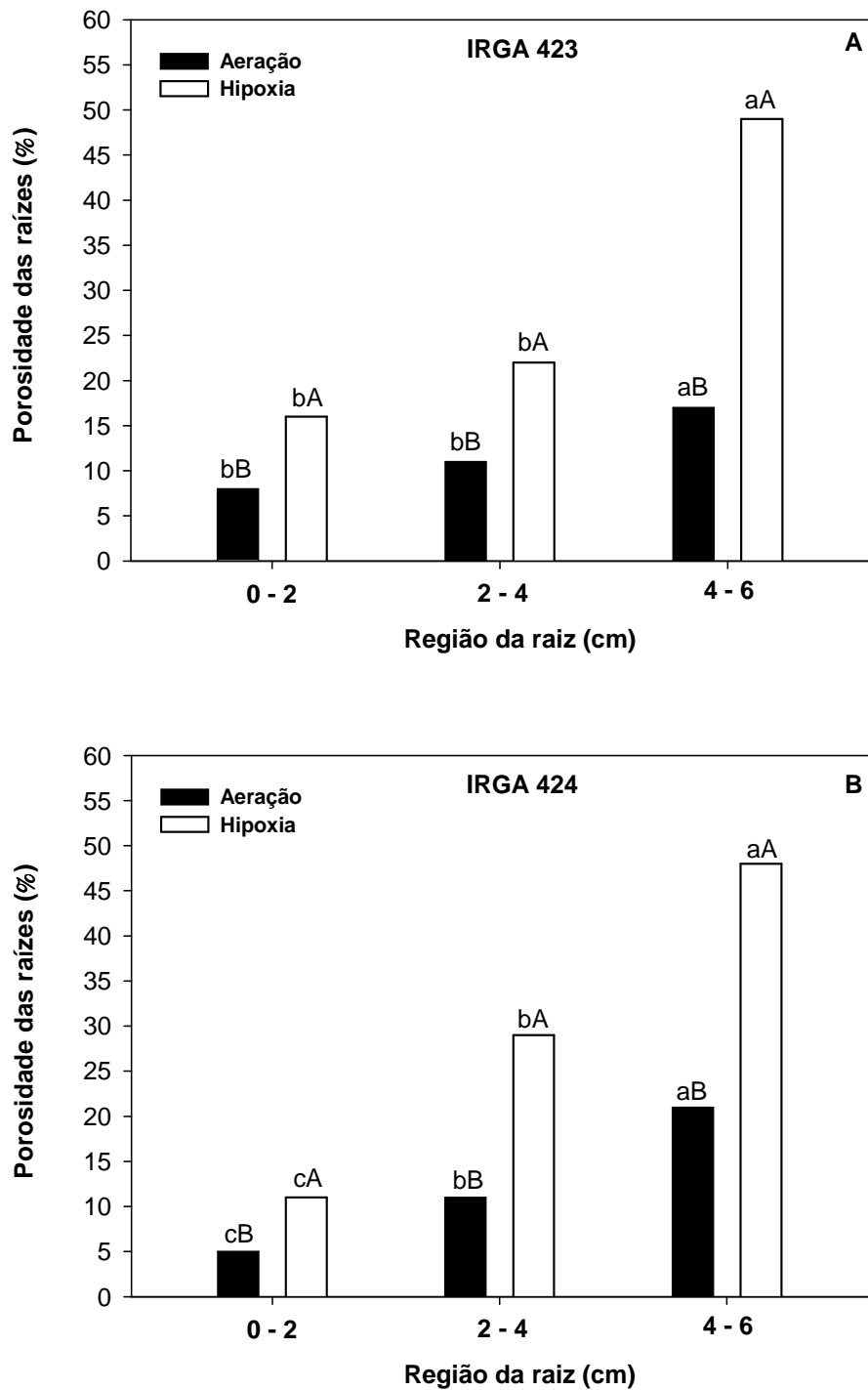
#### **4.1.6. Resultados e discussão**

A porosidade das raízes foi maior quando submetidas ao ambiente sem oxigênio em relação às plantas cultivadas em solução com aeração nos dois genótipos testados (Figuras 7A e 7B), indicando que o método utilizado para cultivo de raízes foi eficiente em retirar o oxigênio e estimular a formação de aerênquima dentro do saco de vinil. A avaliação da porosidade pela determinação em segmentos indica que a formação de aerênquima é maior na medida em que aumenta a proximidade com a base da planta (Figuras 7A e 7B), o que está de acordo com Evans (2003), que relata que a indução à formação de aerênquima ocorre a partir das primeiras camadas de células do ápice da raiz e aumenta para a base da planta à medida que a raiz se torna mais madura. Para Gunawardena et al. (2001) e Jackson (1985), a redução da concentração de oxigênio determina a produção de etileno, sendo este o sinalizador bioquímico para induzir as rotas metabólicas associadas à morte celular programada e, conseqüentemente, à formação do aerênquima lisígeno.

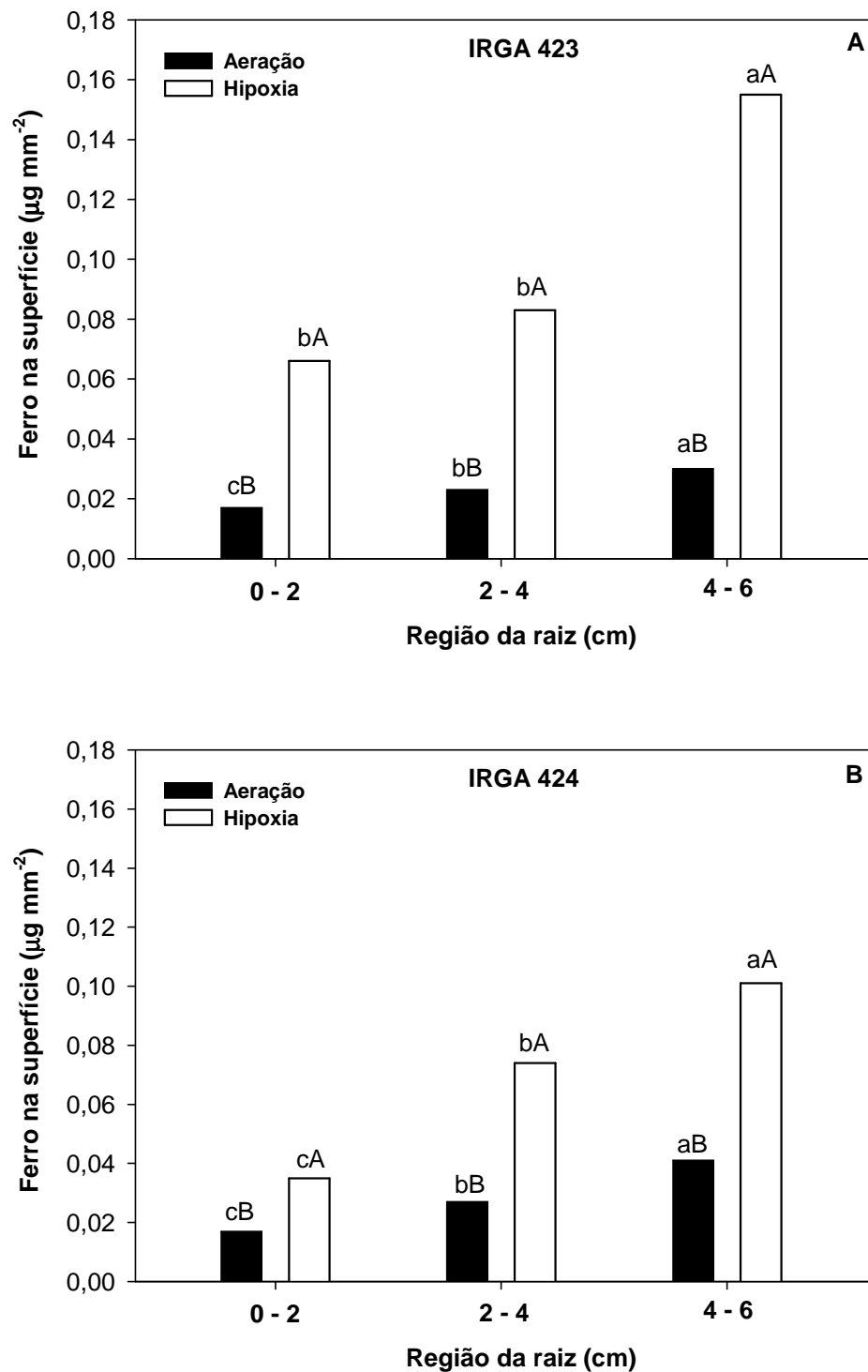
A formação de espaços porosos mesmo nas plantas cultivadas com aeração demonstra que há a formação de aerênquima mesmo em altas concentrações de oxigênio ( $\sim 8 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figuras 7A e 7B). No entanto, convém ressaltar que parte desta porosidade pode ser atribuída aos espaços intercelulares que, de acordo com seu arranjo, formam o aerênquima denominado de constitutivo (Evans, 2003). De acordo com Stolzy (1974), concentrações de oxigênio inferiores a 12% no solo afetam negativamente o

desenvolvimento de raízes de diversas espécies, comprometendo a respiração celular.

As determinações da placa férrica indicam o mesmo comportamento observado para porosidade entre as condições de oxigenação. À medida que a porosidade aumentou, houve um aumento proporcional do ferro oxidado e depositado na superfície das raízes (Figuras 8C e 8D), indicando que a oxidação do ferro pode servir como parâmetro em estudos que visem estimar a magnitude da formação de aerênquima da raiz. Esta hipótese é reforçada pela correlação significativa entre a determinação da placa férrica e da porosidade (Figura 9). A formação da placa férrica foi diferente entre os dois genótipos dentro de cada segmento nas raízes crescidas em hipoxia (Figuras 8C e 8D). Essa variação pode ser atribuída a diferenças na permeabilidade da raiz, o que influencia diferentemente na liberação de oxigênio para o meio externo. A permeabilidade da raiz é determinada basicamente pela composição química dos tecidos e o arranjo das células da epiderme e mesoderme, que são modificadas no decorrer do tempo e aumenta à medida que se aproxima da ponta da raiz (Evans, 2003).

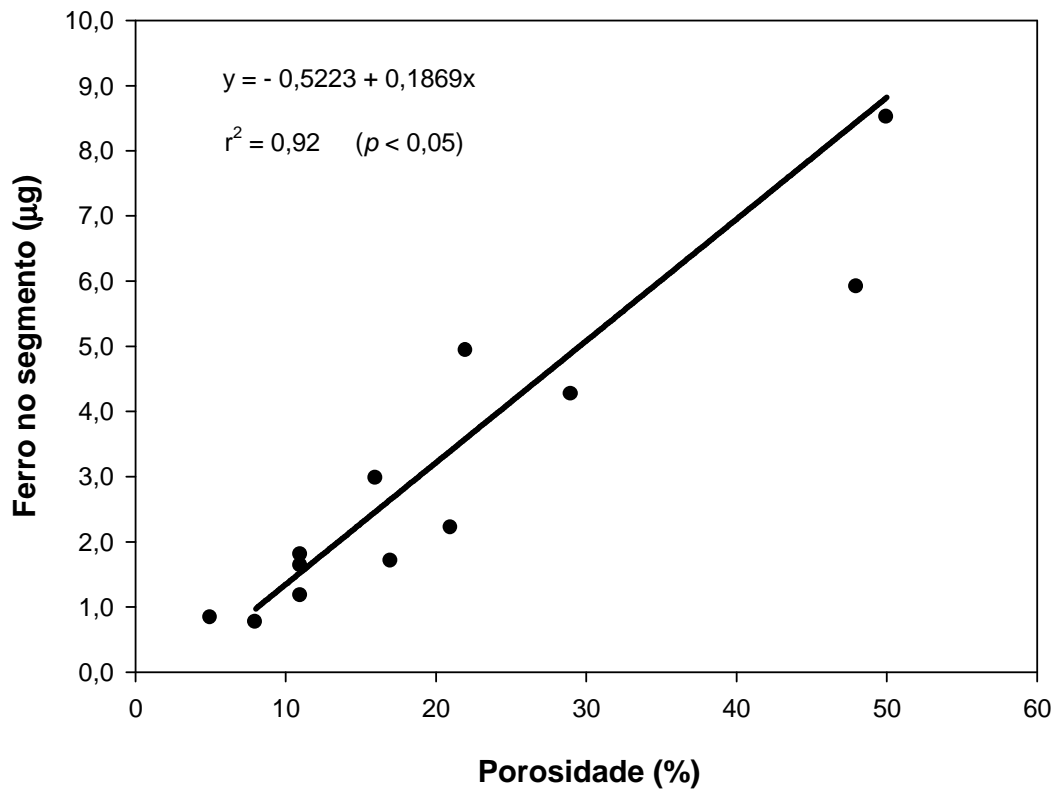


**Figura 7** - Porosidade de raízes adventícias dos genótipos de arroz IRGA 423 (A) e IRGA 424 (B), em função do tratamento das raízes: com e sem oxigenação (hipoxia) em três segmentos. Letras minúsculas comparam as regiões da raiz e letras maiúsculas comparam condições de oxigenação pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).



**Figura 8** - Teores de ferro na superfície das raízes adventícias dos genótipos de arroz IRGA 423 (A) e IRGA 424 (B), em função do tratamento das raízes: com e sem oxigenação (hipoxia) em três segmentos. Letras minúsculas comparam as regiões da raiz e letras maiúsculas comparam condições de oxigenação pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).





**Figura 9** - Relação entre porosidade e quantidade de ferro em segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz (IRGA 423 e IRGA 424), mantidos em ambiente com aeração e hipoxia.

#### 4.1.7. Conclusão

A metodologia de cultivo de plantas de arroz dentro de sacos de vinil enterrados no solo alagado foi eficiente em formar um ambiente de hipoxia, tal como ocorre em condições de cultivo de arroz em solos alagados, permitindo o estudo da formação do aerênquima e placa férrica em raízes adventícias.

## **4.2. Experimento 2 - Oxidação do ferro na superfície de raízes adventícias e sua relação com a formação de aerênquima em genótipos de arroz**

### **4.2.1. Introdução**

No trabalho anterior foi descrita e testada uma metodologia para avaliar a porosidade de raízes de arroz e como esta se relaciona com o ferro que é oxidado na sua superfície. A técnica mostrou que a falta de oxigênio no ambiente radicular estimula a formação de aerênquima que, por sua vez, aumenta a concentração de ferro oxidado na superfície da raiz (placa férrica).

A intensidade do transporte interno de gases é influenciada por fatores intrínsecos da planta, determinados por sua carga genética, sugerindo que haja diferenças entre espécies e até mesmo entre cultivares, como é o caso do arroz (Aulakh et al. 2000). Plantas que possuem maior capacidade de formar aerênquima, teoricamente transportam mais oxigênio para a ponta das raízes, podendo favorecer seu crescimento e, conseqüentemente, promover um maior aprofundamento do sistema radicular, o que pode ser desejável em vista do volume de solo explorado na busca por nutrientes. Devido à variação no volume de aerênquima entre cultivares, a quantidade de oxigênio liberado pelas raízes de arroz pode ser diferente e influenciar o desenvolvimento de microrganismos aeróbios junto à rizosfera (Colmer, 2003; Evans, 2003). Isto pode afetar a intensidade das reações químicas e biológicas e, conseqüentemente, a disponibilidade de alguns nutrientes importantes para as

plantas, como o nitrogênio (Ponnamperuma, 1972). Assim, considerando que existam diferenças entre cultivares na capacidade de formar aerênquima, é possível inferir que haja diferença na capacidade de oxidar o ferro na rizosfera e a determinação da quantidade de ferro oxidado poderia servir como parâmetro para diferenciar cultivares quanto à sua capacidade de transportar e liberar oxigênio para a rizosfera.

#### **4.2.2. Hipóteses**

- A quantificação da porosidade e do ferro acumulado na raiz pode servir como estimativa da magnitude do aerênquima e do potencial de difusão do oxigênio para a rizosfera.

- A formação de aerênquima e da placa férrica é variável entre genótipos de arroz geneticamente contrastantes.

#### **4.2.3. Objetivo**

Utilizar a metodologia da obtenção de raízes em hipoxia para estimar a formação de porosidade e da placa férrica em raízes de diferentes genótipos de arroz cultivados no RS e SC que apresentam uma base genética contrastante.

#### **4.2.4. Material e métodos**

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Estação Experimental do Arroz (EEA) do Instituto Rio-Grandense do Arroz (IRGA) localizada no município de Cachoeirinha – RS, no período de dezembro de 2008 a fevereiro de 2009.

Foram comparados os seguintes genótipos de arroz, representando uma ampla base genética: EPAGRI 108, EEA 406, BR-IRGA 409, IRGA 417, IRGA 420, IRGA 423, IRGA 424, IRGA 3073, Bluebelle, Orizica, Azire QM 1010 (IRGA), Avaxi, Sasanishiki e Formosa. Os genótipos foram previamente cultivados a campo em um Gleissolo Háplico até a fase inicial de florescimento. O preparo das plantas, o desenvolvimento de novas raízes adventícias e a

determinação da porosidade e da placa férrica seguiram a metodologia descrita no Experimento 1 do presente estudo.

#### **4.2.5. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise da variância ( $p < 0,05$ ) e, quando significativas, foi realizada a comparação entre médias dos tratamentos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

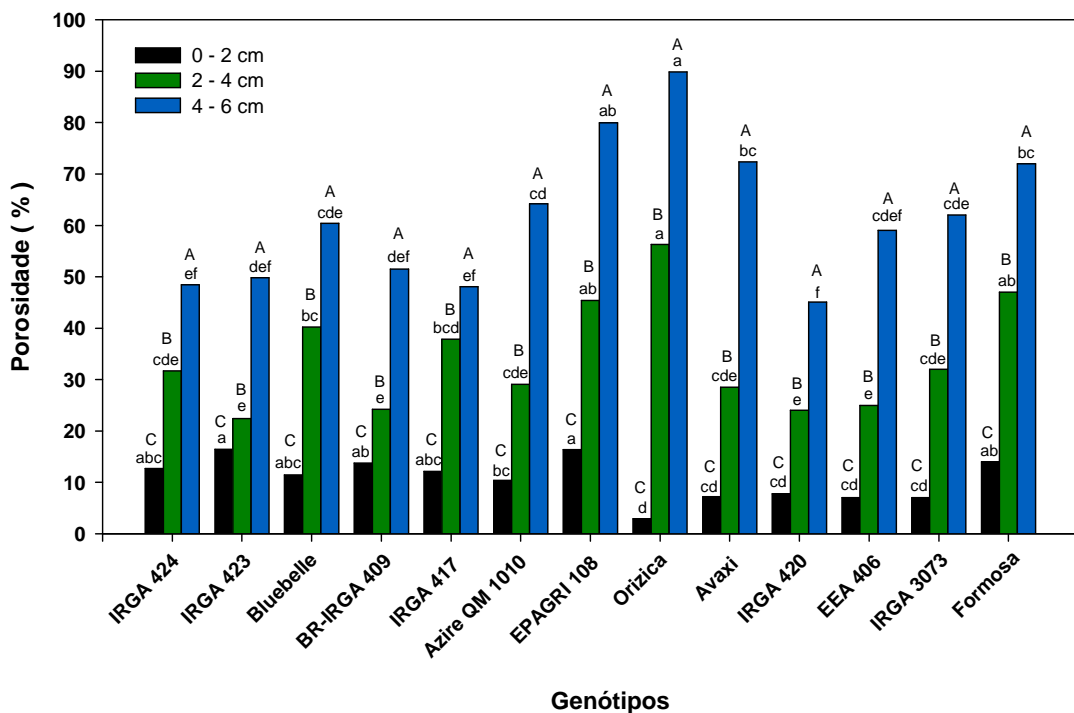
#### **4.2.6. Resultados e discussão**

O volume de espaços porosos variou ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos para cada um dos três segmentos avaliados e também entre os segmentos (Figura 10). Para todos os genótipos, a porosidade aumentou linearmente do ápice para a base da raiz, à medida que esta foi se tornando mais madura (Figura 10). A amplitude destas variações dentro de cada segmento foi de 2 a 16%, 22 a 56% e de 45 a 89% para 0 – 2 cm, 2 – 4 cm e 4 – 6 cm respectivamente (Figura 10), indicando que o contraste genético determina que os genótipos respondam diferentemente à limitação de  $O_2$ . Variações expressivas entre genótipos de arroz e entre regiões da raiz também foram relatadas por Armstrong (1971) e Armstrong & Armstrong (2005).

Com base em uma avaliação visual, foi possível observar que, após o período de crescimento das novas raízes adventícias, o sistema radicular apresentou diferenças marcantes em diversos aspectos morfológicos, principalmente no número de raízes emitidas, no comprimento, no diâmetro e na formação de raízes laterais (número e distância de emissão em relação ao ápice) (dados não apresentados). Os genótipos EPAGRI 108, Bluebelle, Formosa e Orizica desenvolveram raízes de maior diâmetro, mais curtas e em menor número do que as raízes dos demais genótipos (dados não apresentados). De um modo geral, as maiores porosidades foram observadas nos genótipos que apresentaram maior diâmetro de raiz (dados não apresentados), concordando com Armstrong (1979) e Sorrel et al. (2000), que

ressaltam a importância da espessura da estrutura de colmos e de raízes no volume de aerênquima formado.

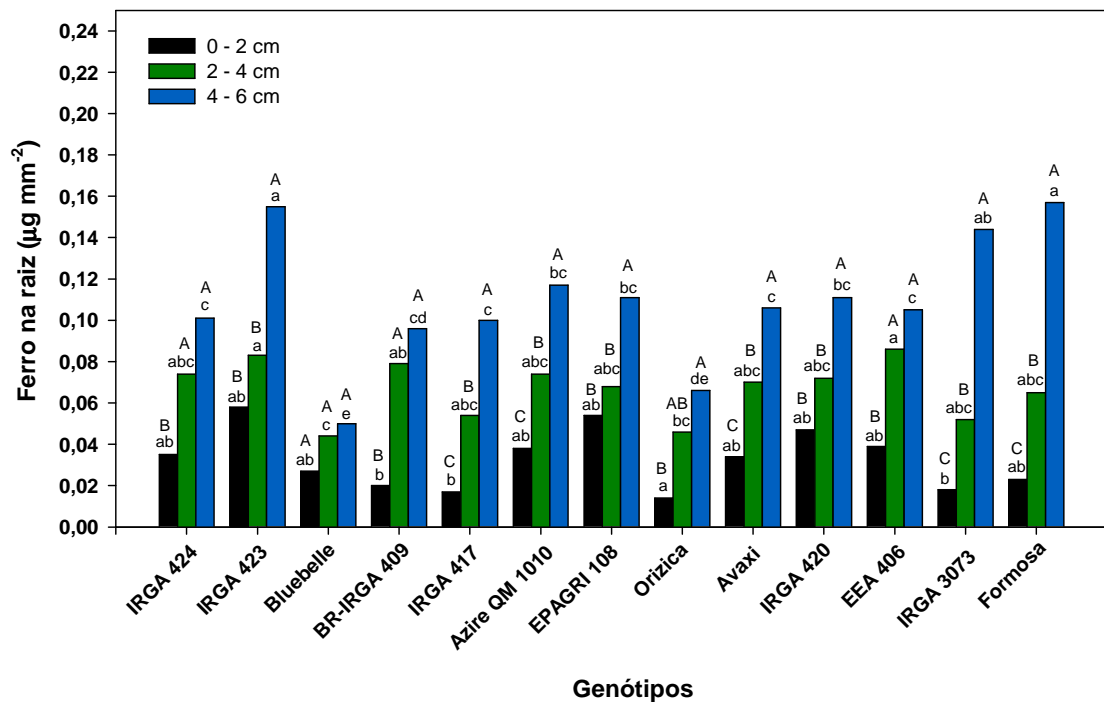
Ao comparar os resultados da porosidade dos genótipos IRGA 423 e IRGA 424 do experimento com os resultados obtidos no teste da metodologia de acordo com o item 3.1.4.4, é possível observar uma similaridade entre os valores (Figuras 7, 8 e 10). Isto indica que a metodologia utilizada para criar um ambiente de hipoxia para obter raízes adventícias foi igualmente eficiente em retirar o oxigênio e estimular a formação de aerênquima dentro dos sacos de vinil, reproduzindo a condição nos diferentes tanques para os 13 genótipos.



**Figura 10** - Porosidade em três segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz obtidas em hipoxia. Letras minúsculas comparam genótipos para cada segmento e as letras maiúsculas comparam segmentos dentro de cada genótipo pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

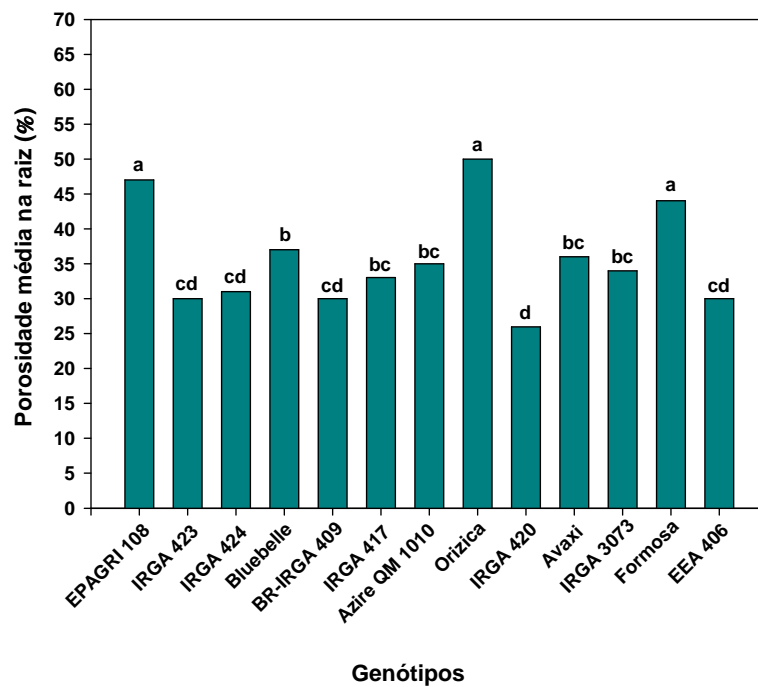
A quantidade de ferro acumulado na superfície das raízes (placa férrica) formada pela difusão do oxigênio para a rizosfera também foi diferente ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos e entre os segmentos avaliados (Figura 11). De um modo geral, a quantidade de ferro oxidado aumentou do ápice (0 - 2 cm) para a região mais madura da raiz (2 - 4 e 4 - 6 cm), acompanhando o comportamento da formação de aerênquima para todos os genótipos (Figura 10). Isto indica que há relação positiva entre a porosidade, o ferro oxidado e o

oxigênio transportado através do aerênquima. Entretanto, embora seja favorável, esta relação não permite quantificar a perda radial total de oxigênio pelas raízes. Isto por que, somente uma parcela do oxigênio liberado é consumida nas reações de oxidação do ferro e, possivelmente, a maior parte seja consumida pelos microrganismos, pela respiração celular e pelo montante das demais reações de oxidação que ocorrem na região da rizosfera do arroz (Kludze et al., 1993; Hosono & Nouchi, 1997; Kirk, 2004). Entretanto, como a avaliação da placa férrica realizada neste experimento teve, como principal objetivo, diferenciar genótipos quanto à formação de aerênquima e liberação de oxigênio, a metodologia utilizada foi sensível e adequada para este propósito, ainda que, não permita determinações exatas dessas duas variáveis.

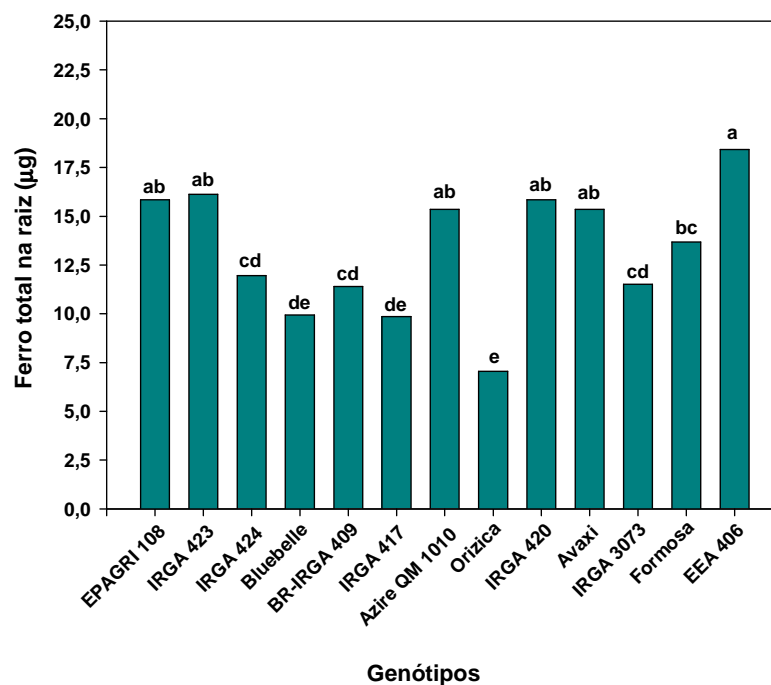


**Figura 11** - Distribuição do ferro em três segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz obtidas em hipoxia, após a exposição a uma solução de um Gleissolo Háplico com pH = 6,0 e 80 mg L<sup>-1</sup> de ferro. Letras minúsculas comparam genótipos para cada segmento e as letras maiúsculas comparam segmentos dentro de cada genótipo pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

A relação da porosidade com o ferro acumulado nos diferentes segmentos avaliados indica que, embora o aumento da porosidade se relacione positivamente com a quantidade de ferro oxidado, esta relação não é proporcional e linear entre os genótipos (Figuras 10 e 11). Este comportamento torna-se mais visível, quando se considera a formação da porosidade média e o somatório do ferro acumulado ao longo dos segmentos (Figuras 12 e 13). É possível observar que, para alguns genótipos como o EPAGRI 108, o Orizica e o Formosa, que apresentam as maiores porosidades médias, necessariamente não apresentam as maiores quantidades de ferro oxidado ao longo da raiz. Por isso, não é possível afirmar que o volume de poros por si só, é o fator determinante da quantidade de oxigênio liberado para a rizosfera. Este fato é mais evidente para o genótipo Orizica, que possui a maior porosidade e a menor quantidade de ferro oxidado por unidade de área de raiz, assim como para o IRGA 420, que apresenta menor porosidade do que o Orizica, porém com maior formação de placa férrica (Figuras 12 e 13). De maneira semelhante, os genótipos Azire QM 1010, IRGA 423, Avaxi e EEA 406, que apresentam porosidades médias intermediárias, possuem os maiores valores de ferro total (Figuras 12 e 13). Este tipo de comportamento ocorre, porque cada genótipo apresenta variações na permeabilidade das raízes, tanto para o oxigênio, como para outros gases, água, nutrientes e produtos tóxicos, alterando a dinâmica das trocas entre o interior da raiz com o meio externo (Colmer, 2003; Kirk, 2004; Kotula & Steudle, 2008).



**Figura 12** – Porosidade média relativa em três segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz produzidos em condições de hipoxia. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

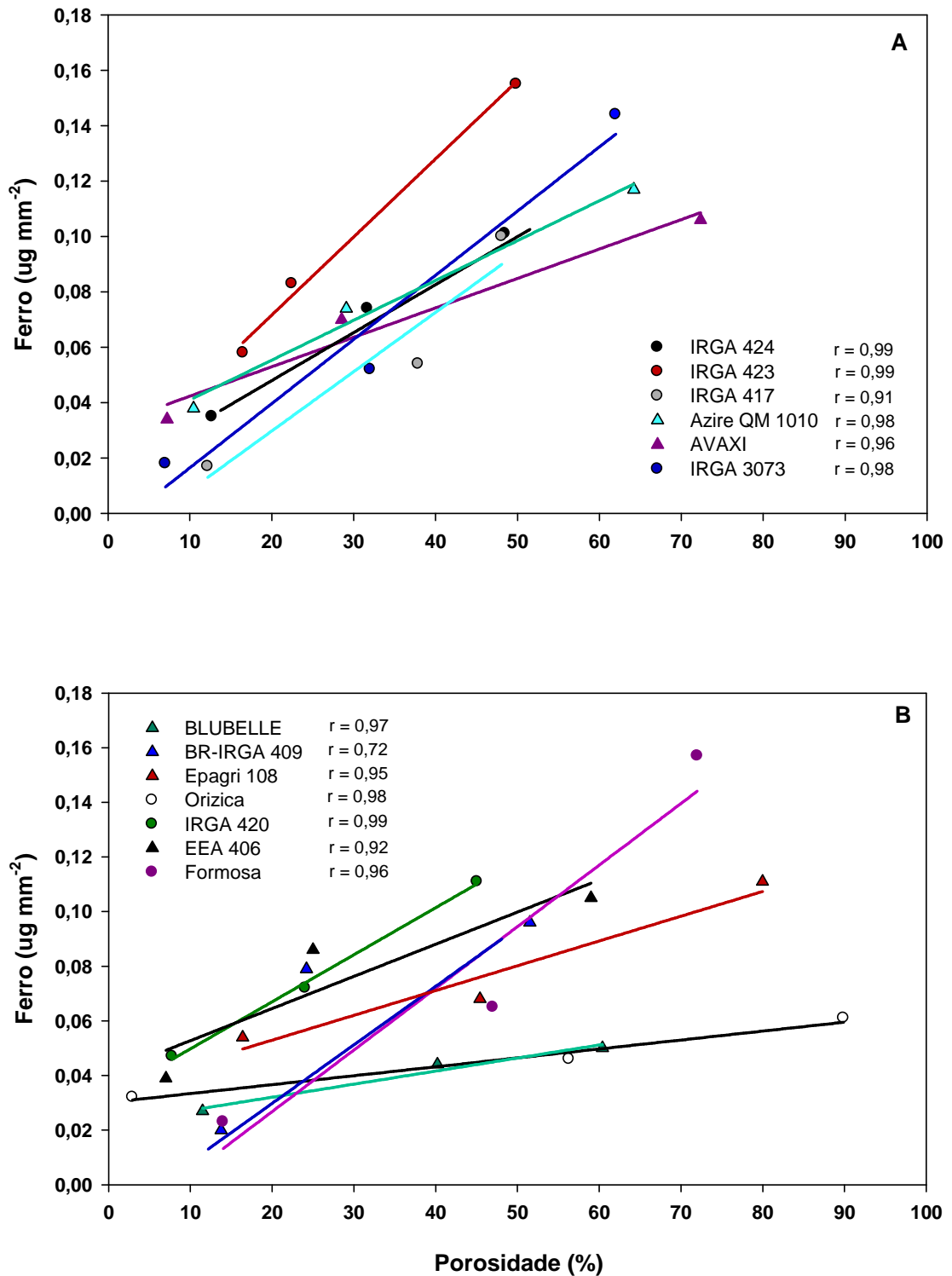


**Figura 13** - Ferro total (soma dos três segmentos) na superfície de raízes adventícias de genótipos de arroz após a exposição a uma solução de um Gleissolo Háptico com pH = 6,0 e 80 mg L<sup>-1</sup> de ferro. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).



Ao correlacionar a porosidade das raízes com o ferro oxidado na superfície nos diferentes segmentos, é possível avaliar melhor o comportamento dessas duas variáveis, ao observar as variações nas inclinações das curvas de regressão (Figura 14 A e B). Nas curvas onde a inclinação é mais acentuada, como para os genótipos IRGA 423, IRGA 3073 e Azire QM 1010, é possível observar que, menores porosidades determinaram maior quantidade de ferro oxidado, assim como, as curvas que apresentam inclinações semelhantes, porém com porosidades diferentes, possuem quantidades semelhantes de ferro oxidado (Bluebelle x Orizica) (Figura 14 A e B). Nestas duas situações, é possível identificar maior permeabilidade dessas raízes ao oxigênio. Ao contrário, as curvas que apresentam menor inclinação, como para o EEA 406 e EPAGRI 108, a formação da placa férrica é mais baixa, mesmo apresentando maior porosidade, sugerindo que a permeabilidade das raízes destes genótipos ao oxigênio é menor (Figura 14 A e B).

Além da formação do aerênquima, outra importante adaptação da planta à falta de oxigênio no solo alagado é a formação de barreiras físicas que impedem ou reduzem a saída de oxigênio nas camadas de células mais externas da raiz, permitindo que o suprimento de oxigênio se mantenha em níveis adequados dentro dos tecidos da raiz, principalmente no ápice (Armstrong, 1979; Colmer, 2003; Kotula et al., 2009). A formação dessas barreiras é determinada por características das paredes celulares das células que compõem as camadas da epiderme e exoderme das raízes, como a espessura e composição química (Colmer, 2003). O acúmulo de polímeros de lignina e suberina ao redor das células da exoderme e endoderme confere resistência à perda radial de oxigênio, tornando-se um fator determinante da permeabilidade das raízes (Armstrong et al., 2000; De Simone et al., 2003; Soukup et al., 2006; Armstrong & Armstrong, 2005).



**Figura 14** - Correlação entre a porosidade e o ferro total em segmentos de raízes adventícias de genótipos de arroz (A e B) obtidas em hipoxia, após quatro horas de exposição à solução de um Gleissolo Háplico com pH = 6,0 e 80 mg L<sup>-1</sup> de ferro.

Em arroz, o grau de suberização e lignificação das paredes celulares aumenta significativamente à medida que a raiz se torna madura e é apontado como o principal fator para redução da perda de oxigênio pela raiz (Kotula & Steudle, 2008; Armstrong & Armstrong, 2005; Kotula et al. 2009). Por outro lado, considerando que, na região mais próxima ao ápice da raiz, a formação dessas barreiras é menor, devido essa região estar em pleno crescimento (Kotula & Steudle, 2008; Armstrong & Armstrong, 2005; Kotula et al. 2009), a quantidade de ferro acumulado também é pequena (Figura 11). Isto ocorre porque a porosidade nessa região também é menor (Figura 10) e, aliado a isso, é nessa região que a taxa respiratória das células é mais intensa, consumindo, portanto a maior parte do oxigênio que chega até esse local (Kirk, 2004). Por outro lado, Armstrong & Armstrong (2005) observaram que a perda radial de oxigênio foi maior na zona próxima ao ápice de raízes adventícias de arroz cultivadas em condições de baixa disponibilidade de  $O_2$ , comparadas às plantas cultivadas em solução aerada. Esses autores sugerem, no entanto, que a maior perda de  $O_2$  seja devido à maior formação de aerênquima nas plantas cultivadas em hipoxia e, conseqüentemente, ao maior transporte de oxigênio.

Embora a perda de oxigênio para o meio externo à raiz pareça um processo negativo, no sentido de reduzir a quantidade de oxigênio disponível para a respiração das células e a formação de barreiras serem agentes na redução dessas perdas, atenção também deve ser dada ao fato de que a liberação de oxigênio tem importantes funções sobre o metabolismo da raiz. Dentre as principais, está a redução da exposição ao  $Fe^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $H_2S$ ,  $S^{-2}$ ,  $HS^{-}$ , ácidos orgânicos. (Armstrong, 1970; Begg et al., 1994; Revsbech et al., 1999). Por outro lado, as barreiras que reduzem a permeabilidade da raiz ao oxigênio, também interferem na entrada de água e de nutrientes na raiz (Armstrong, 1979; Koncalova, 1990; Kirk, 2003). De acordo com Kirk (2004), a região mais madura das raízes teria menor importância no processo de absorção de água e de nutrientes, quando comparada com a região do ápice, principalmente devido à permeabilidade. A maior contribuição de nutrientes e água estaria associada ao desenvolvimento das raízes laterais, devido ao maior número, área superficial específica e ainda, por estarem diretamente conectadas com o xilema da raiz.

#### **4.2.7. Conclusões**

1 - A porosidade das raízes adventícias dos diferentes genótipos de arroz avaliados tem relação direta com a formação da placa férrica, porém, com magnitudes distintas para cada genótipo de arroz irrigado; e

2 – A utilização da metodologia de obtenção de raízes adventícias em condições de hipoxia e oxidação do ferro é eficiente e sensível para diferenciar genótipos quanto à capacidade de formar aerênquima e liberar oxigênio para a rizosfera.

## **5. CAPÍTULO IV - ESTUDO 3 - EXPRESSÃO GÊNICA DE *OsNRTS* EM GENÓTIPOS DE ARROZ**

### **5.1. Experimento 1 - Disponibilidade de nitrato em solo alagado e sua influência sobre a expressão gênica de *OsNRT1.1* e *OsNRT2.1* e na absorção de nitrogênio em genótipos de arroz**

#### **5.1.1. Introdução**

No cultivo do arroz irrigado, atualmente a recomendação de N preconiza a aplicação de doses superiores a 100 kg ha<sup>-1</sup> de N (SOSBAI, 2010) para suprir a necessidade das plantas de arroz que, ao longo dos anos, vem sendo geneticamente melhoradas, principalmente no que se refere a aumento de rendimento. Entretanto, pouca pesquisa tem sido dedicada para identificar e aperfeiçoar características que visem melhorar a eficiência de aproveitamento do N pelas plantas, visto que as suas perdas na lavoura são superiores a 50% do N aplicado. Para que a planta seja eficiente em aproveitar o N fornecido, atenção deve ser dada às características do sistema radicular, como as que determinam a eficiência na absorção. A hipótese de que a nitrificação na rizosfera do arroz possa

fornecer N na forma de nitrato para as plantas, cria a necessidade de aprofundar os conhecimentos sobre a importância do nitrato para a nutrição do arroz cultivado sob alagamento. Após entrar na raiz, a passagem do  $\text{NO}_3^-$  pela membrana celular é considerado o passo chave no metabolismo do N (Vaughn & Campbell, 1988; Touraine et al., 2001). Os processos de transporte de nitrato através da membrana indicam que o influxo de nitrato é um processo ativo, mediado por transportadores específicos (Forde, 2000, Forde, 2002). Neste sentido, a identificação dos genes codificantes de proteínas que são responsáveis pela entrada do N na planta, é um pré-requisito para melhor entender os mecanismos que controlam a absorção do nitrato. Os genes pertencentes às famílias *NRT1* e *NRT2* são responsáveis pela formação de transportadores de nitrato nas raízes e permitem estudar com maior detalhe a possibilidade de explorar a expressão gênica na melhoria da absorção de nitrato em arroz. Assim, com base nos resultados obtidos sobre a variação na capacidade de formar aerênquima em diferentes genótipos (Estudo anterior), foi elaborado este trabalho.

### 5.1.2. Hipóteses

- Genótipos de arroz com diferentes capacidades de formar aerênquima podem influenciar a intensidade do processo de nitrificação na rizosfera e, conseqüentemente, nas proporções de amônio e nitrato disponíveis para a planta.
- A variação na concentração de nitrato formado na rizosfera ativa a expressão gênica de transportadores de nitrato na membrana plasmática, tornando possível comparar genótipos na capacidade de absorver essa forma nitrogenada.

### 5.1.3. Objetivos

- Determinar as concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na solução do solo em diferentes profundidades;
- Avaliar as concentrações de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  translocados na seiva do xilema com o fornecimento de nitrogênio na forma de uréia;
- Avaliar a expressão gênica de transportadores de nitrato (*OsNRT1.1* e *OsNRT2.1*) em genótipos de arroz com base genética contrastante.

#### 5.1.4. Material e métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – RS), no período de novembro de 2009 a janeiro de 2010.

As unidades experimentais (UEs) foram constituídas de recipientes de vidro com capacidade para 3,0 litros. O solo utilizado é classificado como um Planossolo Háplico (Streck, 2008). Cada recipiente recebeu 4,5 kg de solo peneirado a 2,0 mm (Figura 15). Os atributos químicos do solo são apresentados no Tabela 9. Foram aplicadas doses equivalentes a 40 kg de  $P_2O_5$  e 70 kg  $ha^{-1}$  de  $K_2O$ , conforme as recomendações preconizadas para a cultura do arroz (SOSBAI, 2007), baseada nos teores iniciais do solo e para obter rendimentos superiores a 9,0 t  $ha^{-1}$ . O nitrogênio foi aplicado na dose equivalentes a 150 kg  $ha^{-1}$ , parcelado em três aplicações, cada uma correspondendo a 1/3 da dose. As fontes utilizadas foram o sulfato de amônio ( $(NH_4)_2SO_4$ ), superfosfato triplo (SFT) e cloreto de potássio (KCl). Os adubos contendo fósforo e potássio foram homogeneizados junto com o solo no momento da preparação das UEs, juntamente com o carbonato de cálcio e de magnésio na relação molar de 3:1 na dose de 1,3 t  $ha^{-1}$  (PRNT 100%), equivalente a 1 SMP para elevar o pH do solo a 5,5, conforme o critério adotado pela CQFS-NRS/SBCS (2004) e SOSBAI (2007), para solos cultivados com arroz sob alagamento. Em cada unidade experimental foi instalado um dispositivo para coletar a solução do solo (Figura 16).



**Figura 15** - Detalhes das unidades experimentais utilizadas para cultivo dos genótipos de arroz em solo alagado em casa de vegetação.

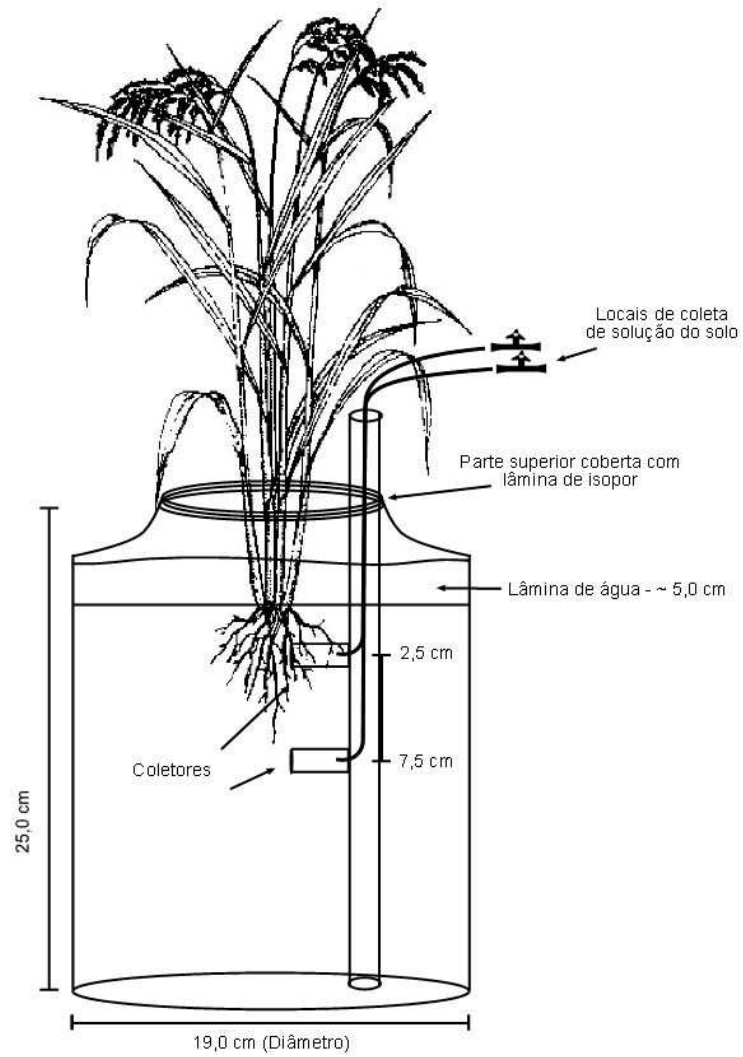
**Tabela 9** - Atributos químicos do Planossolo Háplico antes da instalação dos experimentos

Atributo	Valor
Argila, g kg <sup>-1</sup>	70
Matéria orgânica, g kg <sup>-1</sup>	1,6
pH-H <sub>2</sub> O (1:1)	5,2
Acidez potencial, cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	3,5
Cálcio trocável, cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	0,9
Magnésio trocável, cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	0,5
CTC <sub>ph 7,0</sub> , cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	5,1
Saturação por bases, %	32,0
Alumínio trocável, cmol <sub>c</sub> kg <sup>-1</sup>	0,4
Saturação por alumínio, %	19,2
Potássio disponível, mg kg <sup>-1</sup>	87,0
Fósforo disponível, mg kg <sup>-1</sup>	2,3



Como tratamentos, foram comparados os seguintes genótipos de arroz irrigado: BR-IRGA 409, IRGA 423, IRGA 424, IRGA 417, EPAGRI 108, Bluebelle, Orizica, Formosa, Azire QM 1010 e IRGA 3073. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com seis repetições, totalizando 60 vasos.

A semeadura foi realizada diretamente na UE, na qual, cinco sementes foram alocadas no solo a uma profundidade de 2,0 cm. Quatro dias após a emergência (DAE) estágio V1 (Counce et al., 2000), foi realizado o desbaste, mantendo-se duas plantas em cada UE. No período da semeadura até o alagamento, o solo foi mantido com um conteúdo de água equivalente a 70% da capacidade de campo. Em V4 (Counce et al., 2000) foi aplicada a primeira parcela da uréia em cobertura (1/3) na superfície, com posterior alagamento do solo, mantendo-se uma lâmina de água de 5,0 cm. Em R0 (Counce et al., 2000), foi aplicada a segunda parcela de uréia em cobertura (1/3) com lâmina de água estabelecida.



**Figura 16** - Detalhes do mecanismo utilizado para coleta de solução do solo (a) e ilustração da coleta (b).

## **Avaliações**

A colheita das plantas do experimento foi realizada aos 42 DAE, 24 horas após a terceira aplicação de N em cobertura, sendo as plantas separadas em raiz e parte aérea. Por ocasião da colheita, o experimento foi dividido em duas partes iguais de 30 vasos. Na primeira parte, foram coletadas amostras de raízes adventícias jovens e inteiras que se situavam na camada de 0 – 7,5 cm do solo, imediatamente após a retirada da parte aérea. Essas raízes foram lavadas com água destilada e seccionadas em 2,0 cm a partir do ápice, compondo um total de 30 raízes, das quais, eram separados grupos de 10 raízes que compunham uma repetição, de um total de três repetições por segmento. Após a coleta, cada grupo de 10 raízes foi alocado em tubos do tipo *ependorf* e imediatamente congelados em nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  e armazenadas no mesmo, para posterior análise da expressão gênica dos NRTs.

Do outro grupo de trinta vasos, foram coletadas amostras do xilema, conforme metodologia descrita no Experimento 2, do Capítulo 2. Nessas amostras, foram avaliados os teores de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  na seiva do xilema e os teores de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na solução do solo (Tedesco et al. 1995).

Após as coletas de amostras de raízes e xilema, a biomassa de parte aérea e raízes foram coletadas e, junto com a biomassa dos outros 30 vasos, foram secas em estufa a  $72^{\circ}\text{C}$ , até peso constante para determinação da matéria seca. Amostras de matéria seca foram moídas e preparadas para determinação dos teores de N, K, Ca e Mg (Tedesco et al. 1995). A metodologia utilizada para avaliar a produção e o teor de nutrientes de biomassa, a coleta e análise do xilema no tecido vegetal foi a mesma descrita para o Experimento 2, do Capítulo 2.

A coleta de solução do solo foi realizada utilizando um dispositivo alocado dentro de cada EU (Figura 16). Os coletores foram compostos por tubos de PVC de 20,0 mm de diâmetro por 4,0 cm de comprimento. Em cada extremidade foi fixada uma tela de nylon com malha de 0,1 mm. Os coletores foram mantidos nas profundidades de 2,5 e 7,5 cm. Cada coletor foi conectado a uma mangueira, que seguia até a saída do recipiente de vidro, de onde a solução do solo era succionada com uma seringa, acoplada a uma mangueira

de diâmetro menor do que a mangueira do coletor, visando evitar a sucção forçada da solução. Em cada coleta, inicialmente era feita uma retirada da solução que permanecia no coletor e, posteriormente, eram coletadas as amostras propriamente ditas. Depois da terceira cobertura de N (1/3), aos 42 DAE, foi realizada uma coleta de solução do solo nas profundidades de 2,5 cm e 7,5 cm. Após a extração da solução, as amostras foram imediatamente congeladas, para posterior determinação de  $\text{NH}_4^+$  e de  $\text{NO}_3^-$  (Tedesco et al., 1995). Detalhes do coletor e da coleta da solução do solo são mostrados na Figura 16.

Das amostras de raízes coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido foi avaliada a expressão dos genes codificantes de *OsNRT1.1* e *OsNRT2.1*, assim como o gene codificante da actina, utilizado como controle endógeno da quantidade de mRNA, conforme metodologia descrita a seguir.

### ***Análise da expressão gênica***

#### ***Seleção e síntese de oligonucleotídeos iniciadores***

A seleção dos genes *Oryza sativa* Nitrate Transporters (*OsNRT1.1* e *OsNRT2.1*) e do gene codificante da actina foi efetuada em sílico a partir do banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A síntese de oligonucleotídeos foi realizada nos Estados Unidos pela empresa Invitrogen. A concentração dos oligonucleotídeos foi de  $25 \text{ nmol L}^{-1}$  e a sequência dos mesmos foi a seguinte:

Gene *OsNRT2.1* (registro no NCBI sob o número GBAB008519) (Direto) 5'-CTAGTAGTTGCCATGGACTCG 3' (21 pb) e (Reverso) 5'-ACGACAGCAACCTGATCGTC - 3' (20 pb) com tamanho do fragmento de 184 pb.

Gene *OsNRT1.1* (registro no NCBI sob o número AF140606) (Direto) 5'-ATCAGGATGTTCCCCGTTTG - 3' (20 pb) e (Reverso) 5'-

GCCGATGTGTTTCTCCATCA - 3' (20 pb) com tamanho do fragmento de 107 pb.

Gene ACTINA (registro no NCBI sob o número X15865) (Direto) 5'-CTTCATAGGAATGGAAGCTGCGGGTA -3' (26 pb) e (Reverso) 5'-CGACCACCTTGATCTTCATGCTGCTA -3' (26 pb) com tamanho do fragmento de 196 pb.

### ***Extração de RNA total e isolamento de mRNA***

O RNA total foi extraído a partir das amostras de raízes de arroz, no qual 100 a 200 mg foram triturados na presença de nitrogênio líquido. Foram acrescentados 400  $\mu\text{L}$  de tampão de extração de RNA [100  $\text{mmol L}^{-1}$  de Tris-HCl (pH 9,0); 200  $\text{mmol L}^{-1}$  de NaCl; 15  $\text{mmol L}^{-1}$  de EDTA; e 0,5 % de SDS], 2,3  $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol, 400  $\mu\text{L}$  de solução de fenol equilibrado a pH 8,0 e 80  $\mu\text{L}$  de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v). Após a homogeneização em um agitador tipo vórtex por 2 min, foram acrescentados 28  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 3  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 5,2). Nova agitação foi realizada por 1 min, seguida de uma incubação no gelo por 15 min. Posteriormente, foi realizada centrifugação a 16.000 x g por 10 min a 4 °C. Ao líquido sobrenadante, foram acrescentados 400  $\mu\text{L}$  solução de fenol equilibrado a pH 8,0 e 80  $\mu\text{L}$  de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1, v:v), seguida de agitação vigorosa por 2 min e centrifugação a 16.000 x g por 5 min a 4 °C. Esse procedimento foi repetido com o líquido sobrenadante obtido após a centrifugação.

Após as extrações, os ácidos nucleicos foram precipitados em solução, com a adição de 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol e da incubação por aproximadamente 1 h a -20 °C, seguida de centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. O líquido sobrenadante foi descartado e foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % ao precipitado, seguido de centrifugação a 10.000 x g por 5 min a 4 °C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco à temperatura ambiente. Após, o precipitado foi ressuscitado em 82,5  $\mu\text{L}$  de água ultra pura (Milli-Q) e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A

precipitação seletiva de RNA foi realizada com a adição de 37,5  $\mu\text{L}$  de cloreto de lítio  $8 \text{ mol L}^{-1}$  e incubado em refrigerador a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 16 horas, seguida de centrifugação a  $10.000 \times g$  por 10 min a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O precipitado permaneceu em temperatura ambiente até secar e foi ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. O RNA foi incubado por 10 min à temperatura ambiente antes de ser armazenado à  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A qualidade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1 %, contendo tampão TBE [ $90 \text{ mmol L}^{-1}$  de Tris-HCl (pH 8,3);  $90 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) e  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  de EDTA]. O gel foi corado com brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g. mL}^{-1}$ ), fotografado e analisado através do sistema de fotodocumentação computadorizado de análise de gel (Kodak Digital Science 1D-EDAS 120).

Para obtenção dos mRNAs das amostras foi utilizado aproximadamente  $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de RNA total extraído que foi submetido ao sistema "PolyAtract® mRNA Isolation System III" (Promega), segundo as instruções do fabricante.

### ***Síntese de cDNA***

Para a síntese do cDNA de fita simples (ss cDNA), os mRNAs foram submetidos à reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). Para transcrição reversa (RT), foi adicionado ao mRNA  $320 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada dNTP, tampão 1x (Invitrogen), contendo  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 8,4),  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  de KCl,  $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{MgCl}_2$  e  $6,6 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditiotretitol (DTT);  $1,32 \mu\text{mol L}^{-1}$  de oligonucleotídeo antisense oligo dT (5' – TTTTTTTTTTTTTTTTTT – 3') e 6,4 unidades de enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen). A reação foi incubada a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 1h.

### ***Amplificação dos cDNAs de OsNRTs por RT-PCR e análise por eletroforese em gel de agarose***

A avaliação qualitativa da expressão gênica foi realizada através da análise da reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi composta por  $0,15 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen); 1 U de Taq platinum DNA polimerase (Invitrogen);  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8,4; 50

mmol L<sup>-1</sup> KCl; 3,75 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>; 0,5 μmol L<sup>-1</sup> de cada oligonucleotídeo iniciador e 5 μL de cada amostra de cDNA, totalizando um volume final de 20 μL. A PCR foi realizada em um sistema de detecção de seqüências modelo 7300 Applied Biosystems, com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min; 50 ciclos constituídos de desnaturação a 95 °C por 1 min, pareamento a 60 °C por 1 min, extensão a 72 °C por 1 min, seguido de uma extensão final a 72 °C por 10 min. O produto da reação foi analisado através do perfil eletroforético obtido em gel de agarose 2 % contendo tampão TBE 1x, com o auxílio do marcador de massa molecular 100pb DNA Ladder (Gibco BRL), seguido da exposição em solução contendo brometo de etídio (0,5 μg. mL<sup>-1</sup>). O gel foi visualizado sob luz UV e fotografado com o sistema de fotodocumentação computadorizado EDAS 120 (Kodak Sciences 2d).

### ***Análise da expressão gênica por RT-qPCR***

A expressão gênica em raízes de arroz foi determinada pelo método de quantificação relativa por PCR em tempo real (Reverse Transcription – Quantitative Real Time Polimerase Chain Reaction (RT-qPCR)). A especificidade das condições aplicadas ao RT-qPCR foi verificada através de gel de agarose, conforme condições detalhadas no item 4.1.4.1.1.4 e da curva de dissociação realizada após a reação de amplificação de acordo com as seguintes condições: 95 °C (15 s), 60 °C (1 min), 95 °C (15 s) e 60 °C (15 s).

As amostras para realização da PCR consistiram de 5 μL de cDNA diluído (10 vezes), obtido conforme item 4.1.4.1.1.3. A reação da RT-qPCR foi realizada com mix Platinum® Sybr® Green qPCR – UDG com ROX (Invitrogen) e concentração final dos oligonucleotídeos iniciadores foi de 0,2 μmol L<sup>-1</sup>. A reação foi executada em um sistema de detecção de seqüências modelo 7300 Applied Biosystems. As condições de termociclagem consistiram de 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C e 50 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 min a 50 °C e 1 min a 72 °C. O sinal verde fluorescente do fluoróforo SYBR foi normalizado por um marcador de referência passiva (corante ROX) incluído no mix da Invitrogen. O limiar de fluorescência foi estabelecido no início da curva, representando a taxa de amplificação do amplicon. O número de ciclos pelo qual a fluorescência passou o limiar (C<sub>T</sub>) para cada reação foi calculado pelo programa “7000

*System SDS* – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem) e, posteriormente, exportados para planilhas do programa “Microsoft Excel” para análise. O nível de expressão de cada amostra de cDNA foi obtido pela normalização com um gene endógeno codificante de actina. Os níveis de quantificação relativa do transcrito pelo gene de referência ( $\Delta C_T$ ) foi determinado pela subtração do  $C_T$  do gene endógeno pelo  $C_T$  do gene alvo pela função  $\Delta C_T = C_T(\text{gene alvo}) - C_T(\text{gene endógeno})$ . Os níveis de expressão entre cultivares de arroz, foram ajustados conforme a função de  $\Delta C_T$  e  $\Delta \Delta C_T$  (Livak & Schmittgen, 2001).

### **Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise da variância ( $p < 0,05$ ) e quando significativas, foi realizada a comparação entre médias dos tratamentos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

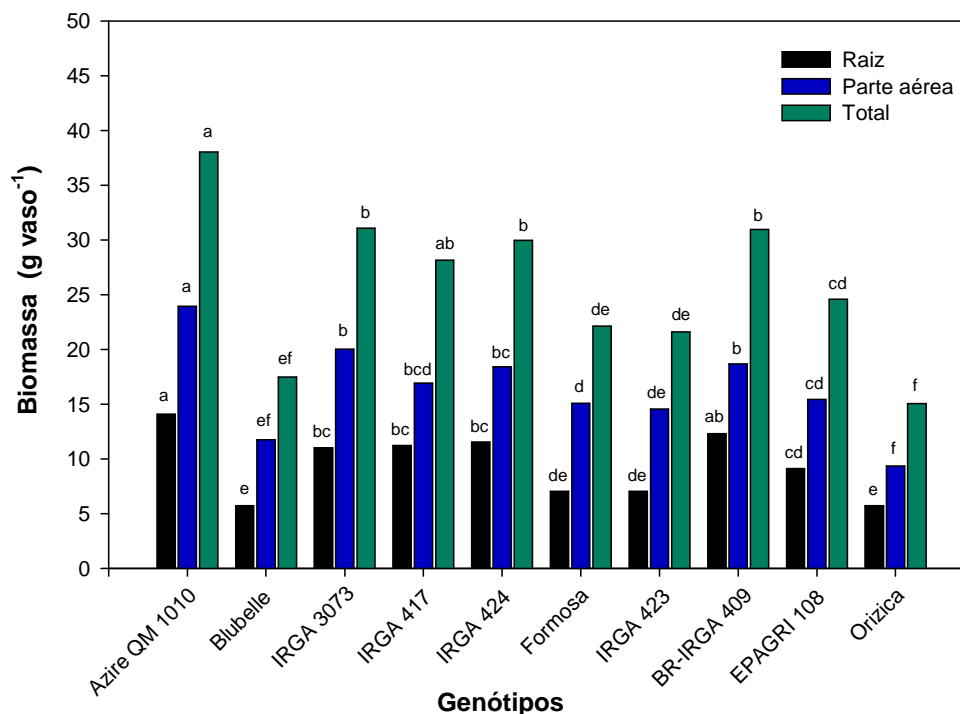
### **5.1.5. Resultados e discussão**

#### **5.1.5.1. Produção de biomassa**

A produção de biomassa dos genótipos testados apresentou diferenças de parte aérea, de raízes e total (Figura 17), indicando a variabilidade genética existente entre eles. Os maiores rendimentos foram obtidos pelos genótipos o Azire QM 1010, a IRGA 3073, IRGA 424 e BR-IRGA 409. A produção de biomassa de raízes foi maior para os genótipos Azire QM 1010, IRGA 3073, IRGA 424, IRGA 417 e BR-IRGA 409 (Figura 17). Embora os maiores rendimentos tenham sido obtidos basicamente, nos genótipos do tipo moderno, que são plantas que apresentam baixa estatura, o vigor inicial, aliado à alta capacidade de perfilhamento são determinantes para que haja um rápido desenvolvimento vegetativo e estabelecimento das plantas na lavoura. Nos programas de melhoramento de plantas, o principal aspecto estudado, é o aumento de rendimento, e isso tem sido alcançado, pelo aumento na capacidade de perfilhamento dos genótipos modernos. Isso resulta no maior



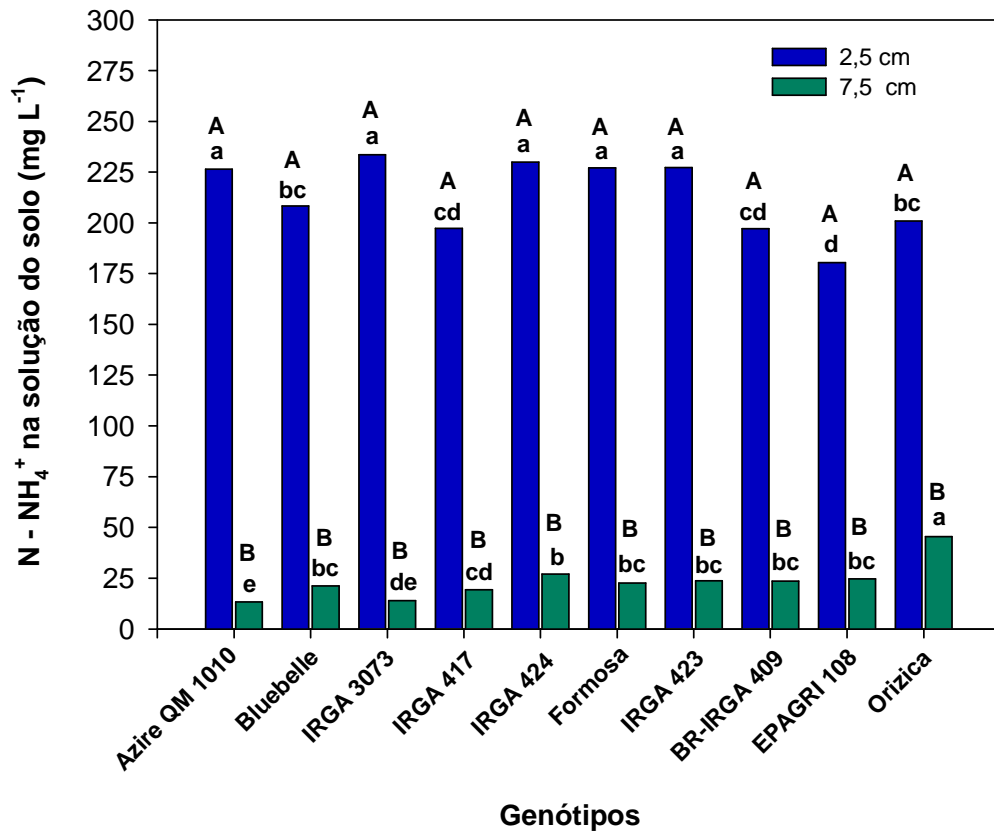
número de perfilhos produtivos e, conseqüentemente, em maior quantidade de grãos por panícula.



**Figura 17** – Produção de biomassa da parte aérea, raízes e total de genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento (42 dias) com aplicação de uréia. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

#### 5.1.5.2. Amônio e nitrato na solução do solo

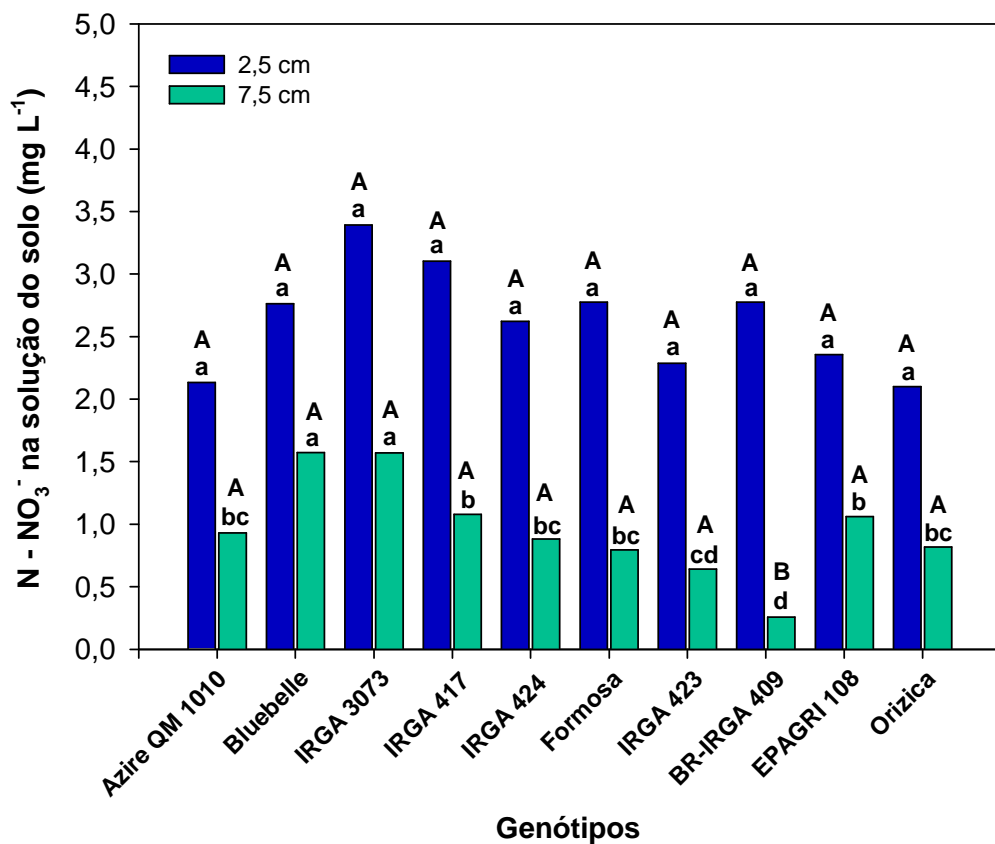
As concentrações de amônio e nitrato determinadas na solução do solo 24 horas após a terceira aplicação de uréia diferiram ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos e entre as profundidades avaliadas (Figura 18). A concentração variou de 180 a 233 mg L<sup>-1</sup> e de 13,0 a 45,0 mg L<sup>-1</sup> nas profundidades de 2,5 e 7,5 cm respectivamente (Figura 18). Os teores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> foram menores na profundidade de 7,5 cm comparada à profundidade de 2,5 cm, apresentando, na maioria dos casos, valores inferiores a 25,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 18). A variação dos teores entre as duas profundidades pode ser devida ao tempo decorrido entre a aplicação do fertilizante e a coleta da solução, insuficiente para promover a descida do amônio.



**Figura 18** - Teores de  $\text{N-NH}_4^+$  na solução do solo (Planossolo Háplico), em duas profundidades, 24 horas após a terceira aplicação de uréia para diferentes genótipos de arroz cultivado sob alagamento. Letras minúsculas comparam genótipos e letras maiúsculas comparam profundidades pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

Após o período de 24 horas da terceira aplicação de uréia no solo alagado, foi possível detectar a presença de nitrato na solução do solo em todos os vasos e nas duas profundidades avaliadas (Figura 19), indicando que, mesmo na condição de solo alagado, houve oxigênio disponível e necessário para promover o desenvolvimento de microrganismos aeróbios nitrificadores. De um modo geral, as concentrações detectadas ficaram abaixo de  $3,5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,19 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e de  $1,6 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,09 \text{ mmol L}^{-1}$ ) nas profundidades de 2,5 e de 7,5 cm respectivamente (Figura 19), sugerindo que, mesmo com elevados teores de  $\text{NH}_4^+$  na solução do solo, como os observados na profundidade de 2,5 cm (Figura 18), a disponibilidade de nitrato foi muito baixa. Na profundidade de 2,5 cm, não houve diferença entre os teores de nitrato para os diferentes genótipos, sendo que na profundidade de 7,5 cm houve variação (Figura 19).

Deve-se considerar, no entanto, que no momento da coleta, que corresponde a 42 dias após o alagamento, o solo já estava em um estado avançado de redução química e em equilíbrio e, possivelmente, as baixas concentrações de nitrato estão associadas, em parte, à absorção pelas plantas e, principalmente, à desnitrificação. De acordo com Ponnampertuma (1972), após um período de 15 a 20 dias do alagamento do solo, há nitrato somente nas zonas oxidadas e, mesmo assim, os teores são muito baixos ou mesmo ausentes, principalmente devido à rápida desnitrificação.



**Figura 19** - Teores de  $N-NO_3^-$  na solução do solo (Planossolo Háplico), em duas profundidades, 24 horas após a terceira aplicação de uréia para diferentes genótipos de arroz cultivado sob alagamento. Letras minúsculas comparam genótipos e letras maiúsculas comparam profundidades pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

### 5.1.5.3. Nutrientes na seiva do xilema

A determinação dos teores dos íons  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  na seiva do xilema apontou diferenças ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos testados (Tabela 10). Para nitrato, os genótipos que apresentaram os maiores teores foram o Azire QM 1010, o IRGA 423, o IRGA 424 e a IRGA 3073 (Tabela 10). Os genótipos EPAGRI 108, Bluebelle, BR-IRGA 409 e Formosa apresentaram valores intermediários e o IRGA 417 e o Orizica, os menores teores (Tabela 10). Embora a concentração de nitrato na seiva do xilema seja considerada baixa, na faixa micromolar, nesta avaliação pontual, o nitrato constituiu de 21 – 25 % do N absorvido em relação ao amônio, para o Azire QM 1010, o IRGA 423, o IRGA 424, a IRGA 3073 e o EPAGRI 108, sendo que, para os demais, a contribuição do nitrato foi menor, variando de 10 a 17% (Tabela 10).

**Tabela 10** - Nutrientes na seiva do xilema de genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com aplicação de uréia

Genótipos	Nutrientes					
	$\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$	$\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$	$\text{K}^+$	$\text{Ca}^{+2}$	$\text{Mg}^{+2}$
	----- mg L <sup>-1</sup> -----					
Azire QM 1010	1,94 ab	5,53 c	2,85 d	441 cd	7,41 ab	39,9 b
Bluebelle	1,19 d	11,85 a	9,96 a	373 e	3,51 ef	34,7 b
IRGA 3073	1,77 ab	8,28 b	4,68 cd	421 de	3,42 ef	36,9 b
IRGA 417	0,79 e	7,07 b	8,95 a	459 cd	6,95 abc	38,6 b
IRGA 424	1,84 ab	8,84 b	4,80 cd	475 bc	3,50 ef	35,9 b
Formosa	1,38 cd	8,24 b	5,97 b	401 e	5,72 bcd	24,3 c
IRGA 423	2,02 a	8,07 b	3,99 cd	407 e	7,93 a	37,4 b
BR-IRGA 409	1,32 cd	8,45 b	6,40 b	519 b	4,17 def	47,9 a
EPAGRI 108	1,68 b	7,77 b	4,62 c	458 cd	5,02 cde	37,5 b
Orizica	0,87 e	8,65 b	9,94 a	628 a	4,35 de	37,2 b
CV, %	12,6	14,3	17,7	6,17	22,5	10,1

<sup>†</sup> Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste do DMS ( $p > 0,05$ );

A presença do nitrato na seiva do xilema (Tabela 10), juntamente com os teores de nitrato observados na solução do solo (Figura 19), reforça o fato de que, mesmo em solo alagado, existem regiões oxidadas nas quais ocorre o processo de nitrificação e que, desta forma, o  $\text{NO}_3^-$  contribui efetivamente para o fornecimento de N para o arroz, juntamente com o  $\text{NH}_4^+$ . De um modo geral, os teores de nitrato encontrados na solução do solo foram baixos e similares em todos os tratamentos (Figura 19), sugerindo que a formação de nitrato ocorreu de forma semelhante no solo, principalmente na camada superficial avaliada. Por outro lado, os teores de nitrato encontrados na seiva do xilema foram diferentes entre os genótipos (Tabela 10). Embora obtidos em experimentos diferentes, existe uma aparente relação entre os teores de nitrato no xilema com a formação da placa férrica, observadas no Experimento 2, do Estudo 2. Partindo do pressuposto de que a intensidade da nitrificação está diretamente relacionada à liberação de oxigênio na rizosfera do arroz (Briones et al., 2002; Briones et al., 2003; Kirk & Kronzucker, 2005; Duan et al., 2006 e Li et al., 2006), a relação entre nitrato no xilema e formação da placa férrica sugere que a formação deste  $\text{NO}_3^-$  possa estar também relacionada à oxidação da rizosfera do arroz. Considerando a dificuldade de se avaliar diretamente e com maior precisão e exatidão a perda radial de oxigênio nas raízes, assim como a nitrificação *in situ*, a avaliação da formação da placa férrica nos diferentes genótipos serve como uma avaliação indireta da liberação de oxigênio das raízes, embora também não permita quantificar exatamente a perda total.

Para o amônio translocado no xilema, o maior e o menor teor foram observados para os genótipos Bluebelle e Azire QM 1010, respectivamente, sendo que, para os demais genótipos, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) (Tabela 10). Considerando a relação  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$ , é possível observar que o Azire QM 1010, o IRGA 3073, o IRGA 424, o IRGA 423 e o EPAGRI 108 apresentaram menores relações às observadas para os demais genótipos, principalmente em relação à Bluebelle, ao IRGA 417, ao Formosa e ao Orizica (Tabela 10). Com base nisto, a contribuição relativa do amônio para o arroz variou de 75 a 90 % do N absorvido no momento da coleta, confirmando neste caso, o fato de que o amônio é a maior fonte de N para o arroz em solo alagado. Entretanto, é importante citar que essa avaliação não permite concluir com exatidão sobre a

contribuição de cada uma das formas, principalmente porque esta foi realizada em um único momento da condução do experimento, quando a disponibilidade de amônio no solo era elevada e, nesse caso, pode-se citar ao menos duas possibilidades sobre essa questão. A primeira está relacionada com o local preferencial de assimilação dos íons  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$  na planta. Como a assimilação do amônio ocorre preferencialmente nas células das raízes (Vaughn & Campbell, 1988; Touraine et al., 2001), é possível que a sua contribuição possa ser ainda maior do que a determinada neste trabalho, visto que uma parcela estaria sendo translocada na forma de aminoácidos, principalmente glutamina, conforme sugerem Vaughn & Campbell (1988). Por outro lado, considerando que a concentração de amônio na solução do solo era elevada, superior a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pode-se supor que, de maneira semelhante ao que foi observado no experimento conduzido em solução nutritiva (Experimento 2, do Estudo 1), a quantidade de amônio absorvida possa ter superado a capacidade de assimilação nas raízes e, nesse caso, os teores encontrados na seiva do xilema constituírem um “excedente” que é transportado para a parte aérea. Considerando, nesse caso, que há excesso de amônio na seiva que, em condições de menor disponibilidade de amônio não ocorreria, a contribuição relativa do nitrato poderia ser maior à determinada, considerando que o nitrato é preferencialmente assimilado na parte aérea da planta e deve ser translocado via xilema (Lips et al., 1990; Takei et al., 2002). Um indicativo de que a contribuição de nitrato para o suprimento de N para o arroz difere entre os genótipos, está ao considerar que, na maioria deles, o teor de amônio na seiva foi similar, porém a contribuição do nitrato, principalmente para os genótipos Azire QM 1010, IRGA 3073, IRGA 424, IRGA 423 e EPAGRI 108 foi maior, comparada aos outros genótipos (Tabela 10).

A presença de amônio na seiva pode estar também relacionada com os sintomas de toxidez que se manifestaram nas plantas. A partir de uma avaliação visual, foi possível identificar alguns sintomas de toxidez por amônio nas pontas das folhas de todos os genótipos de arroz, semelhantes às observadas nos Experimentos 1 e 2, do Estudo 1, em torno de três a quatro dias após a aplicação da uréia, referente às parcelas de 1/3 da cobertura de N realizadas aos 6 e 22 DAE. Entretanto, a partir desse período, os sintomas não se agravaram e as plantas recuperaram a sanidade e se desenvolveram

normalmente. A toxidez pode ter ocorrido devido à rápida elevação nos teores de amônio no solo, semelhantemente ao comportamento observado no momento da coleta de solução realizada no final do experimento, quando, após 24 horas da aplicação da uréia, os teores superaram  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 18). Desta forma, considerando que a quantidade de uréia aplicada foi a mesma nas duas primeiras aplicações, assim como na terceira, correspondendo sempre à 1/3 da dose total de cobertura, os teores, possivelmente, foram semelhantes e, associado a isso, nesses momentos, as plantas eram pouco desenvolvidas e, portanto mais suscetíveis à toxidez. É importante considerar que a elevação dos teores de amônio (Figura 18) pode ser devida à limitada área do vaso e à reduzida altura da lâmina de água (~ 5,0 cm). No cultivo a campo, onde ocorre maior diluição do fertilizante, tanto na lâmina de água, como em um maior volume de solo, há redução na concentração de amônio à qual as raízes ficam expostas, determinando que, em condições de lavoura, normalmente não é observada toxidez por amônio. De acordo com Ponnampertuma (1972), a toxidez por amônio em lavoura pode ocorrer quando a quantidade de N adicionada é muito elevada e/ou quando os solos apresentam baixa CTC e textura arenosa. Outra razão é de que, embora os teores se elevem após a aplicação de N, nos dias que se sucedem há um rápido declínio do amônio no solo e isso determina que os teores na planta também gradativamente se reduzam e, assim, não resulte em toxidez.

Os teores de potássio, cálcio e magnésio no xilema também diferiram ( $p < 0,05$ ) entre os genótipos (Tabela 10). Entre as possibilidades de se avaliar o efeito do amônio sobre o desenvolvimento do arroz, está a interferência desse íon sobre a absorção de outros íons, como  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ . De acordo com Kirkby (1968); Holldampf & Barker (1993); Troelstra et al. (1995); Britto e Kronzucker (2002), o amônio, quando suprido em elevadas concentrações, interfere negativamente na absorção desses cátions. No Experimento 2, do Estudo 1, foi possível identificar a interferência do amônio na absorção de cálcio e de magnésio determinados na seiva do xilema, à medida que a concentração desse íon aumentava na solução nutritiva (Tabela 7). Entretanto, no presente experimento, não foi possível identificar essa interferência. Embora o teor de amônio na solução do solo tenha sido elevado, principalmente na profundidade de 2,5 cm, a concentração desse íon no

xilema, embora diferente ( $p < 0,05$ ), apresentou valores com pequenas amplitudes entre os genótipos e, aliado a isso, as variações nos teores de  $K^+$ ,  $Ca^{+2}$  e  $Mg^{+2}$  são mais expressivas e não permitem identificar alguma interferência entre os genótipos. Uma dificuldade em se fazer esse tipo de avaliação, está no fato de que os diferentes genótipos podem apresentar capacidades diferentes de absorção para cada um desses íons, aliado ao fato de que houveram variações na disponibilidade de amônio em cada tratamento e entre as duas camadas avaliadas, resultante da aplicação da uréia no solo.

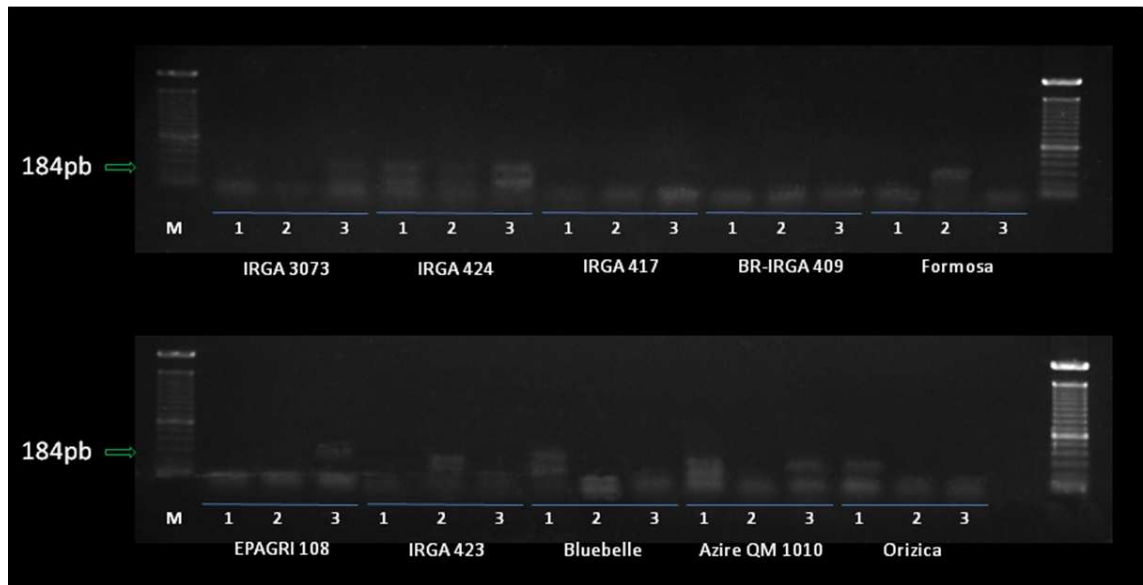
É importante esclarecer que a determinação dos nutrientes na seiva do xilema não teve por objetivo indicar os genótipos mais eficientes em absorver nutrientes e/ou a apontar alguma interação entre eles. Deve-se considerar que esta foi uma avaliação única e pontual, visando identificar a presença de nitrato na seiva do xilema em um momento em que a disponibilidade de amônio era elevada, a qual possibilitaria criar condições de promover maior nitrificação e, conseqüentemente, tornar possível identificar a absorção de nitrato, servindo de fonte efetiva de N para o arroz.

#### **5.1.5.4. Expressão gênica de *OsNRTs***

Visando quantificar o mRNA acumulado dos genes *OsNRT1.1* e *OsNRT2.1*, foi realizada uma avaliação pelo método RT-*q*PCR, tendo como controle endógeno o mRNA do gene codificante da actina. Entretanto, devido aos baixos níveis de acúmulo de mRNA do *OsNRT2.1*, somente foi possível obter produtos de amplificação para o *OsNRT1.1* e para a actina. A partir dos produtos da reação de PCR em tempo real, as amostras referentes ao gene *OsNRT2.1* foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose, para verificar a presença ou ausência do produto amplificado. A partir desta, foi possível confirmar a amplificação de produto com tamanho compatível com o esperado para este gene (Figura 20). Entretanto, somente algumas amostras indicaram formação de produto, as quais apresentaram fraca intensidade do sinal das bandas. Isto pode ser verificado mesmo entre as replicatas biológicas. A explicação mais provável é que a expressão desse gene seja muito baixa e pequenas variações de concentração do mRNA entre plantas não são



suficientes para a reação de amplificação do mRNA para permitir a formação de produto.



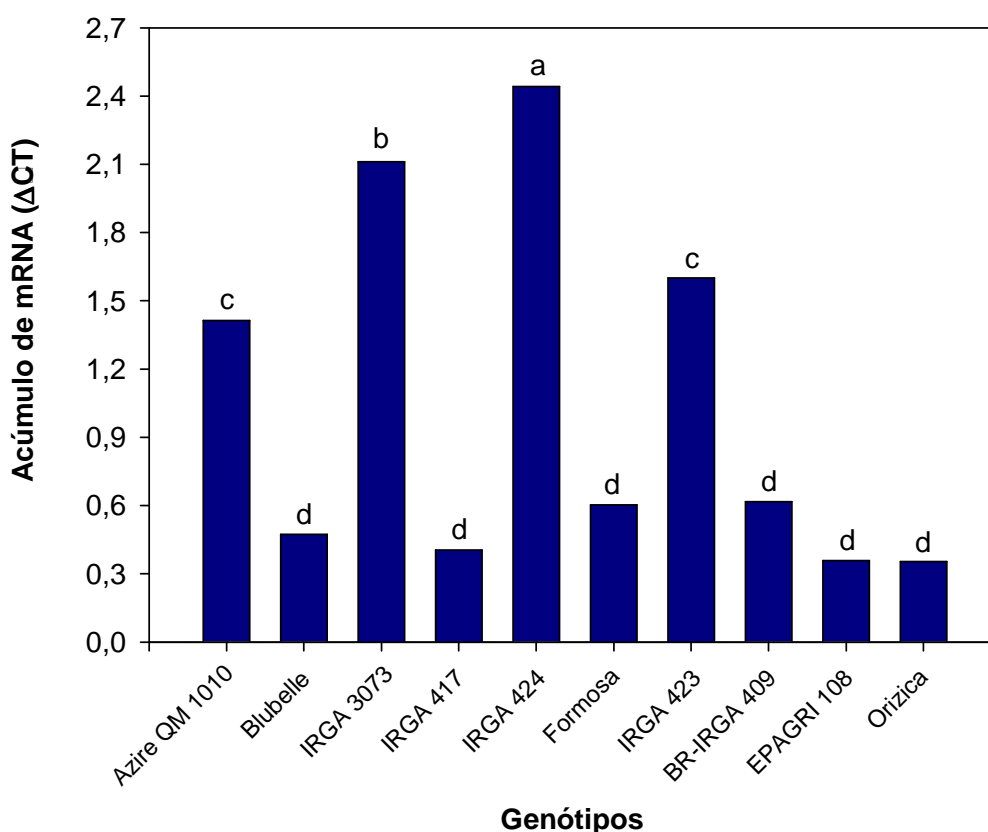
**Figura 20** - Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação do mRNA do *OsNRT2.1* por RT-*q*PCR em genótipos de arroz irrigado cultivados em solo sob alagamento com aplicação de uréia. Os números 1, 2 e 3 referem-se as repetições de cada genótipo e M, ao marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen).

A partir dos dados obtidos por RT-*q*PCR e com auxílio do software “7000 System SDS – Sequence detection, version 1.4” (Applied Biosystem), foi realizado o cálculo automático do limiar de detecção. Entretanto, foi realizado uma correção individual das curvas de amplificação, a remoção dos sinais não-específicos e o ajuste manual do limiar de detecção, para que os resultados fossem obtidos na faixa de amplificação exponencial. Definiu-se, desta maneira, um limiar de detecção distinto para cada gene avaliado.

Os resultados indicaram que o acúmulo de mRNA da actina foi detectado em quantidades iguais ( $p > 0,05$ ) entre os genótipos (Dados não apresentados). A ausência da variação para o gene utilizado como controle endógeno indica a integridade do mRNA extraído, a adequada síntese de cDNA na reação de transcrição reversa e na amplificação do produto durante a reação de PCR. Um dos requisitos para escolha do controle endógeno é a sua presença constante em todas as amostras testadas, para que as variações decorrentes de pipetagens e, conseqüentemente, na concentração final dos

reagentes, da amostra ou variações nas condições das reações de RT ou de PCR sejam corrigidas (Applied Biosystems, 2004).

Na determinação do acúmulo de mRNA do gene *OsNRT1.1* foi possível identificar diferenças ( $p < 0,05$ ) entre genótipos (Figura 21) e separá-los em dois grupos principais. O primeiro grupo, composto pelo Azire QM 1010, o IRGA 3073, o IRGA 423 e, com maior destaque, para o IRGA 424, como as plantas que apresentaram maior acúmulo do mRNA transcrito de *OsNRT1.1* (Figura 21). O segundo grupo é composto pelos demais genótipos testados e é observada uma similaridade nos níveis de mRNA, porém, menores, quando comparados com o primeiro grupo (Figura 21).

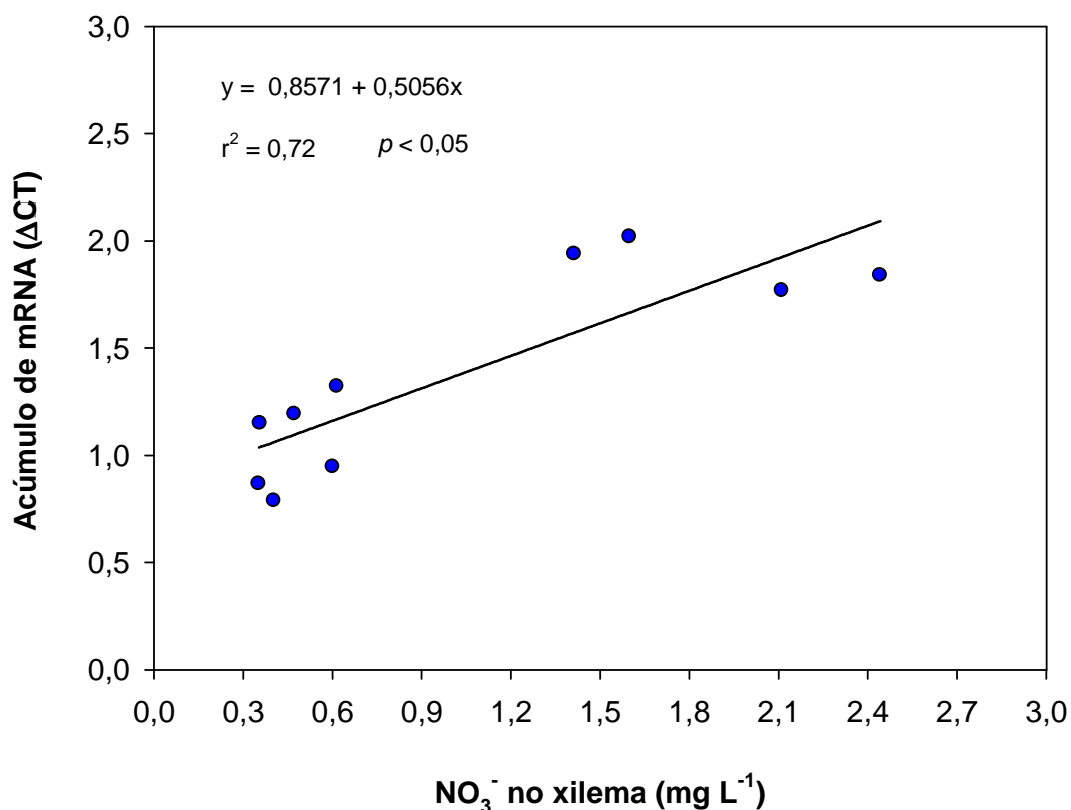


**Figura 21** - Acúmulo de mRNA do gene *OsNRT1.1* em raízes de genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com aplicação de uréia. Letras minúsculas comparam genótipos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

Dentre os genótipos do primeiro grupo, o IRGA 424 está entre os mais cultivados no RS, enquanto que o AZIRE QM 1010 e o IRGA 3073 estão sendo avaliados e são consideradas cultivares promissoras para o cultivo no Estado.

O maior acúmulo de mRNA do *OsNRT1.1* nesses genótipos pode ter alguma relação com o processo de melhoramento, mesmo que este não tenha sido o objetivo da seleção; isto porque são plantas que, de um modo geral, apresentam maior vigor e, possivelmente, maior capacidade de expressar este gene. Por outro lado, os genótipos que apresentaram menor acúmulo de mRNA do *OsNRT1.1*, são cultivares mais antigas e menos produtivas, sugerindo um potencial genético inferior as do primeiro grupo. Diferenças marcantes nos níveis de expressão de *OsNRT1.1* também foram observados por Fan et al. (2005) comparando diferentes genótipos de arroz. Tais variações indicam que o contraste genético entre genótipos deve ser considerado e pode ser utilizado para buscar maior eficiência na aquisição de nitrato pelo arroz, principalmente quando da inserção de uma cópia adicional no DNA da planta.

Ao se considerar o potencial genético da planta no processo de absorção de nitrato no solo alagado, é importante citar que deve existir relação entre a formação deste íon e a capacidade de formar transportadores (NRTs) em cada genótipo. Com base nisso, foi possível relacionar os teores de nitrato determinados na seiva do xilema (Tabela 10) com o acúmulo de mRNA do *OsNRT1.1*. Houve relação positiva entre estas duas variáveis (Figura 22), indicando que a absorção de nitrato foi aumentada em função da disponibilidade de nitrato no solo e pela expressão do gene. Embora este gene seja considerado como constitutivo (Lin et al., 2000), no qual apresenta um nível de expressão basal e constante no tecido da planta, a sua expressão é em parte, baseada no estímulo ou na indução pela disponibilidade de nitrato no meio de crescimento (Forde, 2002). De acordo com Tsay et al. (1993) e Forde (2002) os genes que compõem o grupo dos NRT1 constituem transportadores constitutivos, porém, de caráter nitrato-induzidos. Isto ocorre, porque, analogamente à cinética enzimática de Michaelis Menten, a eficiência do transportador é variável em função da concentração mínima de indução ( $C_{\text{mín}}$ ), da afinidade pelo substrato ( $K_m$ ) e do ponto de saturação ou velocidade máxima ( $V_{\text{max}}$ ). De acordo com Lin et al. (2000), a prova de que o gene *OsNRT1.1* é um transportador de baixa afinidade foi obtida ao testar a resposta deste gene em duas concentrações de nitrato —  $250 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  — no qual, a afinidade do transportador pelo substrato apresentou valores de  $K_m$  variando de 8,0 a 9,0  $\text{mmol L}^{-1}$ .

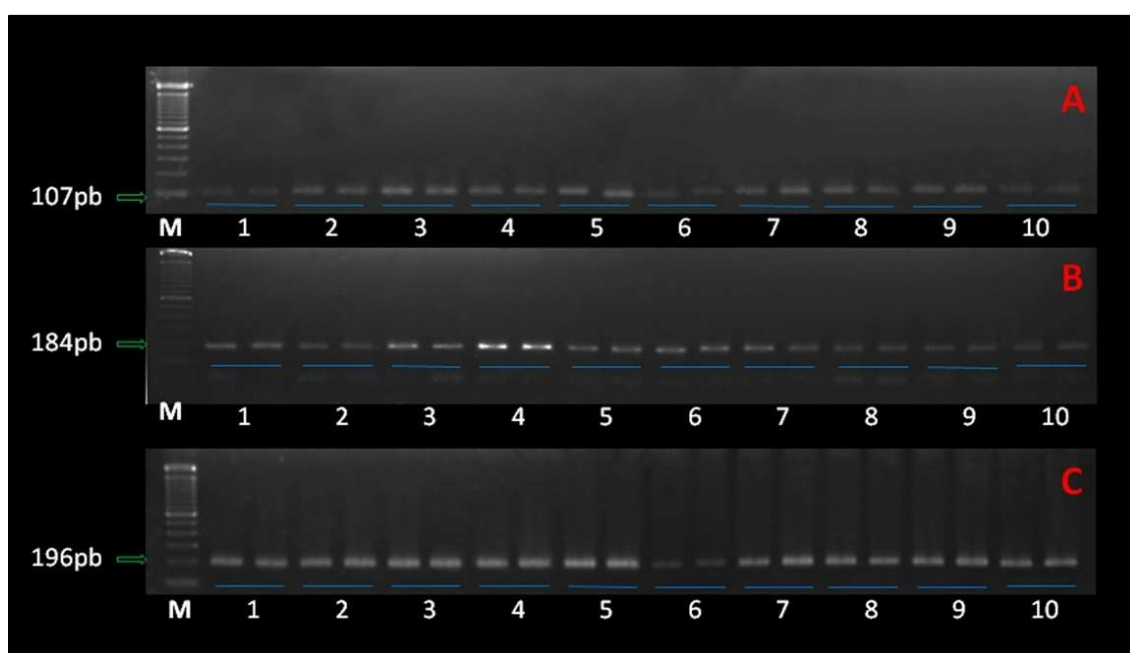


**Figura 22** - Correlação entre acúmulo de mRNA do gene *OsNRT1.1* e teores de nitrato na seiva do xilema de diferentes genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com aplicação de uréia.

Em virtude da não obtenção de produtos de amplificação para o *OsNRT2.1* e também pela baixa resolução da avaliação dos produtos obtidos na reação de RT-*q*PCR mostrados na Figura 20, foram realizadas avaliações complementares com as mesmas amostras de cDNA utilizadas na avaliação de RT-*q*PCR. Nesta, foi utilizado o método de amplificação por RT-PCR e visualização em gel de agarose, com objetivo de obter melhores sinais de bandas e assim, avaliar qualitativamente a expressão dos três genes. É importante esclarecer que as condições de reação e os equipamentos utilizados para realizar as análises de RT-*q*PCR e RT-PCR são diferentes, de acordo com as metodologias adotadas para realizar as duas avaliações descritas anteriormente.

Os perfis eletroforéticos obtidos após a amplificação por RT-PCR com os oligonucleotídeos iniciadores confirmaram o tamanho do produto

amplificado compatível com o esperado para os três genes avaliados, indicando que os métodos adotados foram eficientes no processo de isolamento do mRNA (Figura 23). Entretanto, mesmo obtendo uma melhor definição das bandas em relação à Figura 20, esse método não permitiu avaliar a expressão dos genes no sentido de fazer comparações entre genótipos de forma segura, devido à similaridade do sinal das bandas (Figura 23). O sinal fraco das bandas é decorrente da obtenção de pouco produto de amplificação, em virtude do baixo acúmulo de mRNA do gene nas condições do experimento. Assim, embora não permita avaliar as diferenças entre os genótipos, este resultado é conclusivo ao indicar que o gene foi expresso para todos os genótipos testados (Figura 23), confirmando, com isso, que houve nitrato disponível para ativar a expressão desses genes nas condições de solo alagado.



**Figura 23** - Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação do mRNA de *OsNRT1.1* (A), *OsNRT2.1* (B) e Actina (controle endógeno) (C) em genótipos de arroz cultivados em solo sob alagamento com a aplicação de uréia. 1- IRGA 417, 2- EPAGRI 108, 3- IRGA 3073, 4 - IRGA 424, 5 - BR-IRGA 409, 6 - Formosa, 7 - IRGA 423, 8 - Bluebelle, 9 - Azire QM 1010; 10 - Orizica e M - marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen).

Entre as possíveis causas da baixa expressão do *OsNRT2.1* está a possibilidade de ter havido inibição do gene. A expressão desses genes tem relação direta com o suprimento de nitrato às plantas, considerando que esse íon atua como sinalizador bioquímico para que a transcrição ocorra (Forde, 2000; Forde, 2002). Assim, de acordo com a presença de nitrato no meio de crescimento, haverá ativação da expressão de ambos os grupos simultaneamente, porém, com a predominância ou do grupo dos HATS (High Affinity Transport System) ou dos LATS (Low Affinity Transport System – LATS). De acordo com Kleiner, (1981); Glass & Siddiqi (1995); Crawford & Glass (1998); Forde, (2002) e Britto & Kronzucker, (2005), a expressão do *OsNRT2.1* ocorre principalmente em concentrações de  $\text{NO}_3^-$  abaixo de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $62,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e codifica a formação de um transportador de alta afinidade (HATS). Por outro lado, a expressão do *OsNRT1.1* ocorre principalmente em concentrações de  $\text{NO}_3^-$  acima de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $62,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) e codifica a formação de um transportador de baixa afinidade (LATS). Entretanto, Tsay et al. (1993) e Vidmar et al. (2000) citam que os LATS podem ser expressos em diferentes concentrações de nitrato disponível e podem ser detectados a partir de  $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ . Em *Arabidopsis thaliana*, o transportador codificado por *AtNRT1* pode participar na absorção de nitrato em condições de alta e baixa disponibilidade, sendo assim, considerado um transportador de dupla afinidade (Tsay et al., 1993; Wang et al., 1998; Liu et al., 1999). De acordo com Barbier-Brygoo et al. (2011) a fosforilação de um resíduo de treonina seria o fator responsável por desencadear uma mudança na conformação da proteína que compõe o gene *AtNRT1.1*, determinando com isso, a mudança na sua capacidade de se comportar como um gene HAT ou LAT, dependendo da disponibilidade de nitrato no meio.

No presente estudo, a ocorrência da expressão do *OsNRT2.1* e do *OsNRT1.1* não possibilita caracterizar a concentração na qual os genes foram expressos, porém, indica que houveram condições de disponibilidade de nitrato suficientes para aumentar a expressão de ambos (Figuras 19 e 20). Devido à dificuldade de se determinar diretamente a concentração de nitrato produzida na reduzida região da rizosfera do arroz, principalmente devido à instabilidade química e dinâmica do processo, torna-se difícil inferir se a intensidade da nitrificação é suficiente para atingir concentrações de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  ou maiores

ou se em concentrações inferiores a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  também ocorre a expressão do *OsNRT1.1*. Com base na Figura 19, é possível observar que a disponibilidade de nitrato na solução do solo foi pequena e semelhante em todos os tratamentos. Nesse caso, as variações nos teores de nitrato observadas na seiva do xilema (Tabela 10), aliadas à variação no acúmulo de mRNA dos genes entre genótipos (Figuras 20 e 21), embora não permita concluir sobre a intensidade do processo de nitrificação, indica que houve formação de nitrato nas zonas oxidadas da superfície do solo e da rizosfera, contribuindo efetivamente para suprimento de nitrato para o arroz. De acordo com Kirk & Kronzucker (2005), a concentração de nitrato na rizosfera das raízes de arroz sob alagamento é estimada entre  $1,0$  a  $2,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $0,062 - 0,124 \text{ mg L}^{-1}$ ) mas, por esse ser um processo dinâmico e contínuo, a contribuição do nitrato estimada foi de 34% do total do N absorvido ao longo de 10 dias.

Outra possível causa da baixa expressão dos genes avaliados é de que, quando amônio e o nitrato são supridos juntamente no meio de crescimento, pode haver a inibição da expressão dos NRTs, e a mesma ocorre em níveis menores do que quando a indução é feita somente com nitrato (Araki & Hasegawa, 2009). Como no solo alagado houve predominância de  $\text{N-NH}_4^+$  (Figura 18), é possível que a expressão, principalmente do *OsNRT2.1*, possa ter sido inibida pela presença desse íon, dificultando a determinação. Porém, esse efeito não pode ser confirmado nas condições do experimento e necessita ser melhor estudado.

#### 5.1.5.5. Conclusões

1 – A concentração de amônio na solução do solo é superior a de nitrato, indicando que o amônio é a principal forma de N no solo alagado. Porém, foi possível detectar nitrato na solução, o que indica que houve nitrificação nas zonas oxidadas do solo;

2 – A variação nos teores de nitrato na seiva do xilema indica que os genótipos apresentam diferentes capacidades de absorver essa forma nitrogenada;

3 - A avaliação do acúmulo de mRNA do gene *OsNRT1.1* realizada por RT-qPCR apontou diferenças entre os genótipos avaliados, indicando que o Azire QM 1010, o IRGA 423, o IRGA 424 e o IRGA 3073 apresentam maior potencial em expressar este gene em relação ao IRGA 417, ao EPAGRI 108, ao BR-IRGA 409, ao Formosa, ao Bluebelle e ao Orizica;

4 - Os perfis eletroforéticos não permitiram comparar os genótipos de forma segura quanto ao acúmulo de mRNA para os genes *OsNRT2.1* e *OsNRT1.1*. Porém, o resultado é conclusivo ao indicar que o gene *OsNRT2.1* foi expresso em todos os genótipos testados, confirmando com isso, que houve nitrato disponível para induzir a expressão desse gene nas condições de solo alagado.



## **5.2. Experimento 2 - Expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OsNRT1.1* em genótipos de arroz cultivados em solução nutritiva**

### **5.2.1. Introdução**

Os resultados apresentados no experimento anterior indicaram que a expressão dos genes ocorreu em todos os genótipos testados. Entretanto, como não foi possível quantificar a expressão do gene *OsNRT2.1* por RT-qPCR, o que impossibilitou diferenciar os genótipos, levantou-se a hipótese de que a baixa expressão desse gene poderia estar relacionada a algum efeito inibitório por parte do amônio disponível na solução do solo ou ainda, se foi decorrente da baixa disponibilidade de nitrato.

O grupo de genes que compreende os NRT2s respondem diferentemente à presença de nitrato no meio de crescimento e, por isso, são classificados basicamente em três categorias: nitrato-induzidos, nitrato-repressivos e nitrato-constitutivos (Okamoto et al., 2003). De um modo geral, é observado que a absorção de nitrato tem relação direta com a quantidade de mRNA transcrito de NRT2s em função da indução por esse íon. Entretanto, isso ocorre, por que os diferentes genes que compõem o grupo dos NRTs atuam conjuntamente, determinando o aumento da absorção de nitrato (Zhuo et al., 1999; Okamoto et al., 2003). Embora os genes *OsNRT2.1* e *OsNRT1.1* sejam classificados como constitutivos, os mesmos podem ter a sua expressão aumentada pela indução de nitrato após períodos de deficiência e/ou inibida nas raízes em resposta ao estado nutricional da planta (Araki & Hasegawa, 2009). De acordo com Vidmar et al. (2000), a inibição pode ocorrer devida a

interferência direta do amônio e/ou pela elevação do estado nutricional de nitrogênio da planta. Quando este é elevado, ocorre uma regulação da entrada de N, principalmente na forma de nitrato, o qual apresenta mecanismos reguladores mais específicos do que o amônio, sendo comumente denominado de controle por *feedback* ou retroalimentação (Vidmar et al., 2000; Araki & Hasegawa, (2009). A regulação negativa por retroalimentação da expressão do NRT2.1 é causada pelo movimento descendente de metabólitos nitrogenados, como aminoácidos, principalmente glutamina, e mesmo pelos níveis de amônio na planta (Zhuo et al., 1999; Vidmar et al., 2000; Glass et al., 2002; Araki & Hasegawa, (2009). Kronzucker et al. (1999) observaram que o fornecimento de  $\text{NH}_4^+$  juntamente com  $\text{NO}_3^-$  reduziu o influxo de  $\text{NO}_3^-$  e, ao mesmo tempo, ocasionou um aumento significativo no efluxo do mesmo, indicando que o  $\text{NH}_4^+$  apresenta papel importante na redução direta da absorção de nitrato. Da mesma forma, Araki & Hasegawa, (2009), ao testar diferentes condições de indução de NRTs com nitrato, observaram redução nos níveis de transcritos de NRT2.1 quando as plantas de arroz foram previamente tratadas com amônio, comparadas às plantas sem tratamento prévio.

Com base nisso, formulou-se um experimento complementar visando esclarecer os possíveis efeitos da presença do  $\text{NH}_4^+$  sobre a absorção de  $\text{NO}_3^-$  em genótipos de arroz irrigado do RS e de SC.

### 5.2.2. Hipótese

1 – O suprimento combinado entre  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , inibe a expressão dos genes NRTs e o acúmulo de mRNA ocorre em níveis menores do que quando o  $\text{NO}_3^-$  é fornecido isoladamente.

### 5.2.3. Objetivo

Avaliar a expressão gênica de transportadores de nitrato (*OsNRT1.1* e *OsNRT2.1*) em diferentes genótipos de arroz e condições de disponibilidade de amônio e nitrato em solução nutritiva.

### 5.2.4. Material e métodos

O experimento foi realizado em solução nutritiva em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre – RS) em março de 2010.

As unidades experimentais (UEs) foram constituídas de recipientes de vidro com capacidade para 3,0 litros. Em cada recipiente foi adicionado 2,8 kg de poliestireno cristal granulado, substrato inerte e de densidade superior à da água.

Como tratamentos, foram comparados os genótipos Azire QM 1010, Bluebelle, IRGA 417 e Formosa e as seguintes proporções entre  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ : 0:0, 50:50 e 0:100 utilizadas para fazer a indução dos NRTs.

A semeadura foi feita diretamente na UE, na qual, cinco sementes foram alocadas no substrato a uma profundidade de 2,0 cm. Quatro dias após a emergência (DAE), estágio V1 (Counce et al., 2000), foi realizado um desbaste, mantendo-se duas plantas em cada UE, momento em que também foi iniciado o fornecimento de solução nutritiva. Para compor as soluções nutritivas, foram utilizadas as seguintes fontes:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , KCl e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . As concentrações finais de cada solução são apresentadas no Tabela 11. A solução contendo micronutrientes foi composta por: Mn - ( $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 0,0047 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), Cu - ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,0047 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), Zn - ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,0015 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), B - ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,023 mmol  $\text{L}^{-1}$ ), Mo - ( $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,00011 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e Fe (Fe-EDTA - 0,5 mg  $\text{L}^{-1}$ ). O pH das soluções foi ajustado até 6,0 com HCl e NaOH 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ .

**Tabela 11** - Composição das soluções nutritivas utilizadas para induzir a expressão dos genes *OsNRT1.1*, *OsNRT2.1* e Actina em genótipos de arroz

Elemento	Tratamentos		
	$\text{NH}_4^+$ 0:0 $\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$ 50:50 $\text{NO}_3^-$	$\text{NH}_4^+$ 0:100 $\text{NO}_3^-$
	----- mmol $\text{L}^{-1}$ -----		
N	0.00	3.00	1.50
P	1.00	1.00	1.00
K	2.00	2.00	2.00
Ca	2.00	2.00	2.00
Mg	1.25	1.25	1.25
S	5.25	3,25	3.25
Cl	2.00	1.00	1.00

A condução do experimento foi realizada em três etapas, divididas em função do suprimento de N na solução nutritiva. Na primeira etapa, que compreende o período dos 4 DAE até os 15 DAE, foi fornecida uma solução nutritiva na proporção  $\text{NH}_4^+$  50:50  $\text{NO}_3^-$  (3,0 mmol L<sup>-1</sup> de N) igualmente para todo o experimento (36 vasos), com o objetivo de proporcionar condições adequadas de suprimento de nutrientes visando um desenvolvimento inicial satisfatório e uniforme das plantas. Na segunda etapa, após os 15 DAE, a solução nutritiva foi drenada e os vasos lavados sucessivamente com água destilada para remover a solução remanescente. Após as lavagens, o experimento foi mantido durante cinco dias com solução nutritiva na ausência de nitrogênio, necessário para causar o declínio do teor de N na planta e reduzir a atividade de NRTs. Após os 20 DAE, a solução nutritiva foi drenada e os vasos novamente lavados sucessivamente com água destilada. Na terceira etapa, o experimento foi dividido em três partes de 12 vasos, nos quais foram administrados os tratamentos de N utilizadas para fazer a indução dos NRTs. Os tratamentos foram os seguintes:  $\text{NH}_4^+$  0:0  $\text{NO}_3^-$  (testemunha),  $\text{NH}_4^+$  50:50  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  0:100  $\text{NO}_3^-$ . A administração das soluções de indução de NRTs foi feita durante 3 horas. Logo após o término do período de indução, as plantas foram imediatamente retiradas dos vasos, tendo a parte aérea separada das raízes. As raízes foram lavadas com água destilada. Vinte raízes uniformes foram separadas e cortadas a 2,0 cm acima do ápice, das quais, foram formados dois grupos de 10 raízes, que constituíram duas repetições técnicas. Todos os grupos de raízes foram acondicionados separadamente em tubos do tipo *ependorf* de 1,5 mL e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas no mesmo até a análise da expressão gênica.

Foi avaliada a expressão dos genes *OsNRT2.1*, *OsNRT1.1* e *Actina* através do acúmulo de mRNA. A metodologia de extração e purificação do mRNA, assim como os métodos de análise por RT-PCR e RT-qPCR foram os mesmos descritos para o experimento anterior.

As UEs foram dispostas obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, totalizando 36 UEs. Os resultados foram submetidos à análise da variância ( $p < 0,05$ ) e, quando significativos, foi feita a comparação entre médias dos tratamentos pelo teste do DMS ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.5. Resultados e discussão

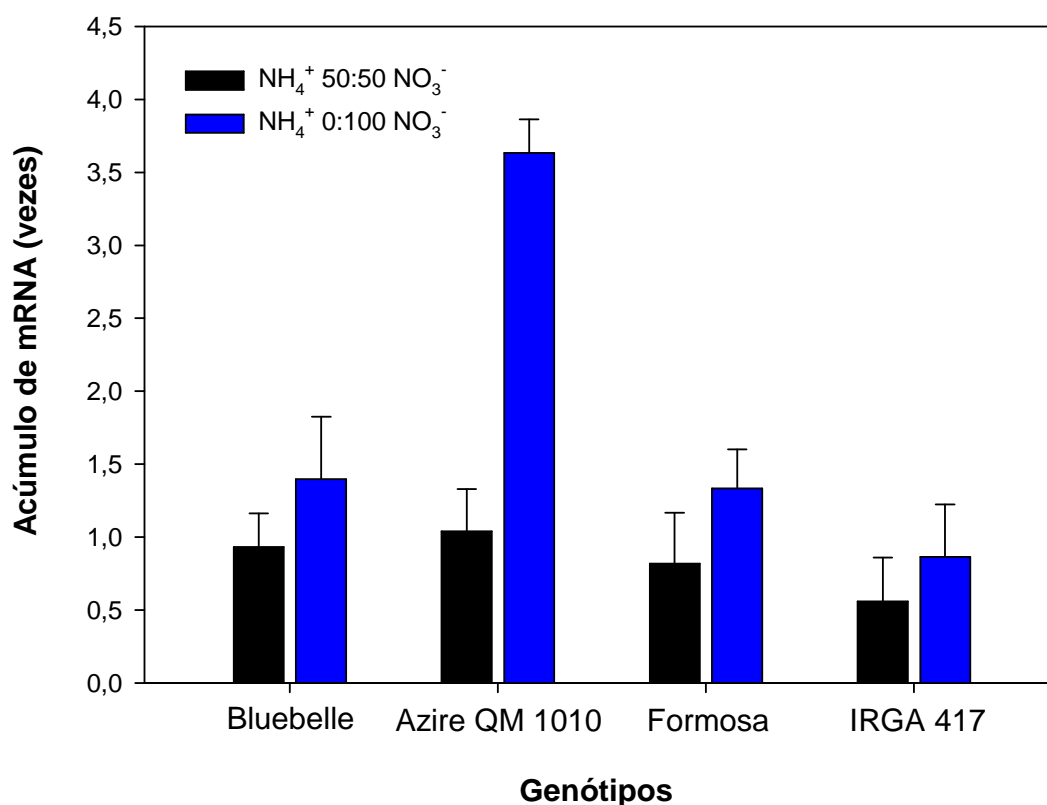
Este trabalho foi conduzido visando esclarecer se o amônio apresenta algum efeito inibitório sobre a expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OSNRT1.1*. Como a disponibilidade de N foi igual dentro de cada tratamento, isso permitiu uniformizar as condições para todas as raízes e, desta forma, concluir com mais segurança sobre esse efeito.

A avaliação feita por RT-*q*PCR somente permitiu a quantificação do acúmulo de mRNA dos genes *OsNRT1.1* e da Actina, porém, não do *OsNRT2.1*, semelhantemente ao que aconteceu no experimento anterior. O gene da Actina foi detectado em quantidade similar em todas as amostras ( $p > 0,05$ ) (Dados não apresentados).

Na avaliação por RT-*q*PCR, houve diferença nos níveis de mRNA do gene *OsNRT1.1* entre genótipos, sendo que o Azire QM 1010 apresentou um maior acúmulo em relação aos demais ( $p < 0,05$ ) (Figura 24). Este resultado está de acordo com o obtido no experimento anterior, quando o Azire QM 1010 também apresentou maior acúmulo de mRNA que o IRGA 417, o Bluebelle e o Formosa, indicando que o Azire QM 1010 foi mais eficiente em absorver nitrato do que os demais (Figura 21). É importante citar que, embora os genes avaliados tenham caráter constitutivo, existe resposta crescente na absorção de nitrato em função da concentração no meio de crescimento até atingir os níveis de saturação da capacidade do transportador. O IRGA 417, o Bluebelle e o Formosa apresentaram comportamento semelhante ao observado na Figura 21, evidenciando a menor capacidade de formar esses transportadores. Na proporção 50:50 não houve diferença entre o Bluebelle, o Azire QM 1010 e o Formosa, sendo que o IRGA 417 diferiu do Azire QM 1010 e do Bluebelle (Figura 24). O acúmulo de mRNA no tratamento 0:100 foi superior ao observado na Figura 21 para todos os genótipos, indicando que a indução feita somente com nitrato foi eficiente em apontar a interferência do amônio sobre a expressão do *OsNRT1.1* (Figura 24).

O efeito da indução indicou que o acúmulo de mRNA do gene *OsNRT1.1* foi crescente em todos os genótipos, em função da disponibilidade de nitrato e presença do amônio na solução. Isto indica que, embora as concentrações de nitrato fossem as mesmas nos tratamentos 50:50 e 0:100, equivalentes a  $1,5 \text{ mmol L}^{-1}$ , a resposta na expressão do gene foi diferente

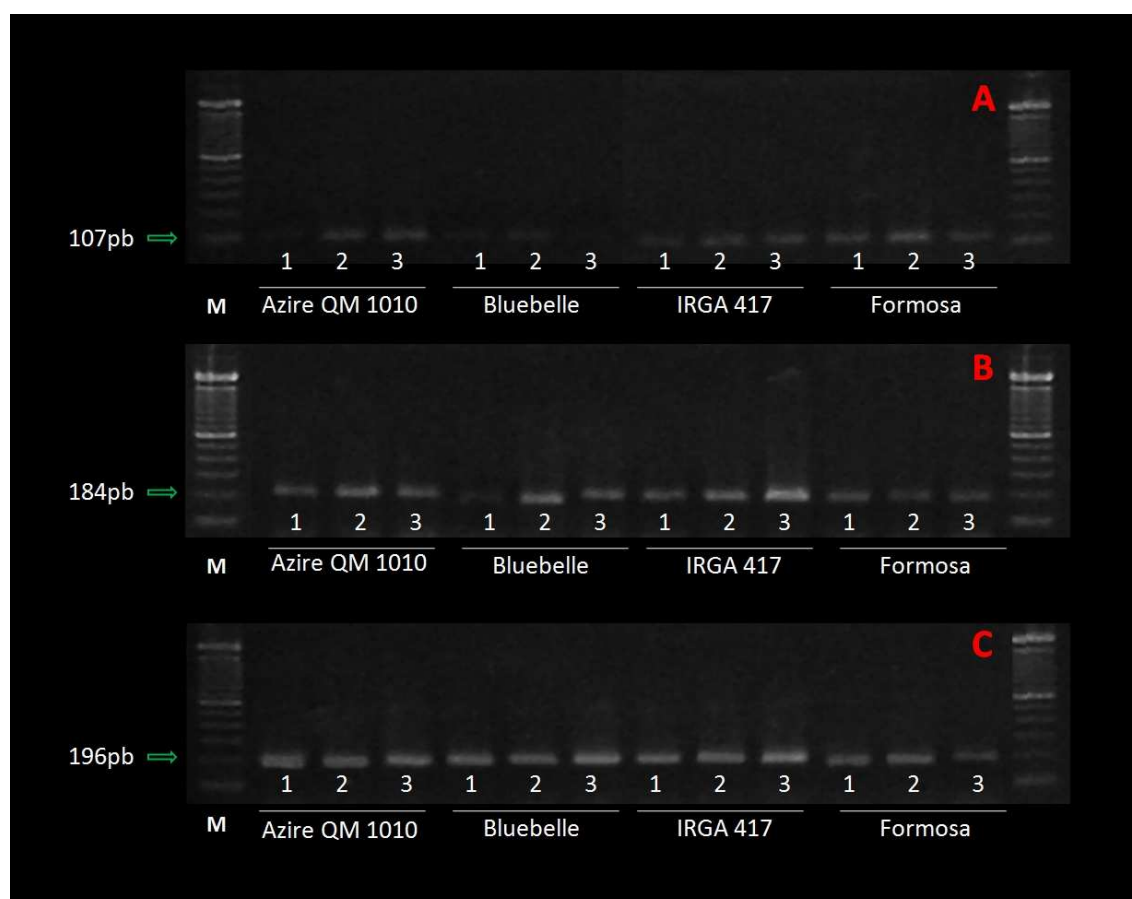
entre eles, indicando que houve inibição quando na presença de amônio (Figura 24).



**Figura 24** – Acúmulo de mRNA do gene *OsNRT 1.1* em raízes de genótipos de arroz cultivados em solução nutritiva.

De maneira semelhante ao obtido no experimento anterior, devido às dificuldades na obtenção de produtos de amplificação para o *OsNRT2.1* e também pela baixa resolução da avaliação dos produtos obtidos na reação de RT-*q*PCR (dados não apresentados), foram também realizadas avaliações complementares com as mesmas amostras de cDNA utilizadas na avaliação de RT-*q*PCR, porém utilizando o método de amplificação por RT-PCR e avaliação em gel de agarose. Nesta avaliação, foi possível confirmar a compatibilidade dos produtos obtidos, indicando que os métodos adotados foram eficientes no processo de isolamento do mRNA (Figura 25). Entretanto, esta avaliação também não permitiu avaliar a expressão dos genes em resposta aos tratamentos utilizados para fazer a indução, nem tampouco realizar

comparações entre os genótipos de forma segura (Figura 25). Desta forma, semelhante ao ocorrido no experimento anterior, o método é conclusivo ao indicar que o gene *OsNRT2.1* foi expresso para os genótipos testados nas condições do experimento (Figura 25). Embora este gene seja mais expresso em condições de baixa disponibilidade de nitrato, na faixa micromolar, também houve expressão em condições de disponibilidade na faixa milimolar (1,5 mmol L<sup>-1</sup>), porém em menor intensidade. Isto está de acordo com Glass & Siddiqui (1995), Wang & Crawford (1996) e Crawford & Glass (1998), que relatam que na faixa milimolar, há maior expressão dos genes que codificam transportadores de baixa afinidade (LATS), como o *OsNRT1.1* e, em função disso, a expressão dos genes que codificam transportadores de alta afinidade são inibidos.



**Figura 25** - Perfis eletroforéticos em gel de agarose da amplificação do mRNA dos genes *OsNRT2.1* (A), *OsNRT1.1* (B) e Actina (controle endógeno) (C) em diferentes genótipos de arroz cultivado em solução nutritiva. Tratamentos de indução: (1) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0:0 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, (2) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 50:50 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e (3) NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 0:100 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e (M) marcador de massa molecular 1 Kb (DNA Ladder, Invitrogen).

A causa da não quantificação do *OsNRT2.1* por RT-*q*PCR possivelmente foi devida à baixa expressão desse gene, o que não possibilitou obter produto de amplificação, somente em alguns casos, mesmo assim, inviabilizando a avaliação do experimento como um todo.

Para o gene *OsNRT1.1* pode-se observar no perfil eletroforético que o gene também foi expresso para todos os tratamentos e genótipos, porém, não segue o comportamento esperado para os tratamentos de indução, o que impossibilita concluir com base nesse tipo de avaliação (Figura 25).

### 5.2.6. Conclusões

1 - A avaliação da expressão do gene *OsNRT1.1* realizada pela técnica do RT-*q*PCR apontou diferenças nos níveis acumulados de mRNA entre os genótipos avaliados, indicando que o Azire QM 1010 apresentou maior potencial em expressar este gene em relação ao IRGA 417, Formosa e Bluebelle;

2 – A avaliação por RT-*q*PCR indicou que a presença do amônio influenciou a expressão do gene *OsNRT1.1*, confirmando o efeito de inibição, em função do acúmulo de mRNA quando o nitrato e o amônio são supridos de forma combinada.

3 - Os perfis eletroforéticos não permitiram comparar os genótipos quanto ao acúmulo de mRNA para o gene *OsNRT2.1*, mas é conclusivo ao indicar que este foi expresso para todos os genótipos testados.



## 6. CONCLUSÕES GERAIS

O suprimento combinado de amônio e de nitrato em solução nutritiva aumenta o desenvolvimento e o crescimento das plantas de arroz, resultando em maior produção de biomassa em relação às fontes supridas isoladamente. O amônio, quando suprido em elevadas concentrações, reduz a absorção de cátions e o desenvolvimento das plantas, indicando que esse íon também pode causar toxidez em determinadas situações, como no suprimento isolado em solução nutritiva. Por outro lado, também são observados efeitos negativos do suprimento isolado de nitrato, principalmente na redução do crescimento das plantas. Entretanto, os resultados dos experimentos indicam que o nitrato é também uma fonte importante de N para a cultura do arroz.

A metodologia criada para obter um ambiente de hipoxia, tal como ocorre em condições de cultivo de arroz em solos alagados, se mostrou eficiente em retirar o oxigênio livre do solo e da solução nutritiva dentro dos sacos de vinil. Com isso, é possível promover a formação de raízes adventícias na ausência de oxigênio, condição necessária para induzir a formação de aerênquima, semelhantemente ao que ocorre em solo alagado. Com base na avaliação da porosidade de raízes e da formação da placa férrica, é possível diferenciar genótipos de arroz quanto à capacidade de formar aerênquima e liberar oxigênio para a rizosfera, indicando que a porosidade tem uma relação direta com a formação da placa férrica, porém, com magnitudes distintas para cada genótipo.

Não foi possível identificar diretamente a ocorrência e a intensidade da nitrificação na rizosfera do arroz. Entretanto, a partir da aplicação de uréia, se observa que o amônio é a forma predominante de N no solo alagado, porém, pequenas quantidades de nitrato foram detectadas, e indicam que a sua formação ocorre nas zonas oxidadas que compõem a superfície do solo e a rizosfera do arroz. A ocorrência da nitrificação nessas

zonas e a importância do suprimento de nitrato para o arroz é reforçado pela detecção deste íon na seiva do xilema, aliado à expressão dos genes *OsNRT1.1* e *OsNRT2.1*. Com base nessas avaliações, os genótipos testados apresentam diferentes capacidades de expressar esses genes e, conseqüentemente, de utilizar o nitrato como fonte efetiva de N.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maior disponibilidade de amônio em relação ao nitrato no solo alagado é um fato conhecido há décadas e, em função disso, há um consenso de que o arroz é uma espécie tolerante ao amônio. Entretanto, os estudos que buscam esclarecer os mecanismos envolvidos nesse processo e em quais condições ocorrem são escassos e resultam na afirmação de que o amônio é a principal fonte de N no solo alagado e que o nitrato, por ser instável nas condições de solo alagado, não seja considerado uma fonte importante de N para o arroz.

No Estudo 2, foi observado que, em concentrações que variaram de  $3,75 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $65,7 \text{ mg L}^{-1}$ ) a  $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$  ( $180 \text{ mg L}^{-1}$ ) de amônio na solução nutritiva, o arroz foi suscetível à toxidez por esse íon, principalmente nos estádios iniciais de desenvolvimento das plantas. No Experimento 1 do Estudo 3 foram observadas concentrações superiores a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  ( $> 10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) quando da aplicação de uréia, portanto, superiores às concentrações citadas anteriormente. Porém, nessa condição também foram constatados sintomas de toxidez por amônio que, porém, não evoluíram a ponto de causar danos à planta, em virtude do rápido declínio da concentração de amônio ao longo dos dias.

De um modo geral, não são observados sintomas de toxidez por amônio em condições de lavoura e a razão para isto certamente está associada a diferentes práticas de manejo que ocorrem na lavoura e não necessariamente deve ser atribuída à planta. Possivelmente, outros mecanismos, que não os bioquímicos ou metabólicos, estão associados a essa suposta tolerância, tais como os morfológicos e, principalmente, fatores externos à planta de arroz. O declínio da concentração de amônio no solo possivelmente é um dos principais fatores e é dependente de outros atuando conjuntamente e que impedem a manutenção de uma concentração elevada e

constante ao longo do ciclo. A diluição do fertilizante na lâmina de água, associada ao seu movimento e entrada contínua, às perdas por volatilização e por desnitrificação, entre outras, determinam a manutenção de baixas concentrações desse íon e, desta forma, impedem a toxidez. A ação conjunta desses fatores resulta na baixa eficiência do fertilizante nitrogenado que se observa nas lavouras de arroz.

Em virtude da predominância de amônio no solo alagado e pela velocidade em que ocorre a desnitrificação, pouca importância foi dada ao nitrato como fonte de N para o arroz ao longo dos anos. Entretanto, nas últimas décadas, principalmente a partir de 1990, uma série de trabalhos foi realizada no sentido de avaliar o suprimento de nitrato para a cultura do arroz irrigado, nos quais se tem mostrado uma importante fonte de N para o arroz.

No presente trabalho, conduzido com cultivares regionais, também ficou evidente a importância do nitrato no fornecimento de N para o arroz, tanto em solução nutritiva, como no solo alagado. Foi observado que o suprimento de nitrato é importante no crescimento e desenvolvimento das plantas e que, no solo alagado, houve nitrato disponível e a capacidade de absorção de nitrato variou entre os genótipos de arroz estudados.

O desenvolvimento diferenciado do sistema radicular dos genótipos de arroz foi um aspecto marcante e indica que a base genética é determinante para o crescimento e o desenvolvimento das raízes em condições de limitação de oxigênio. Foi observada uma ampla variação na formação de espaços porosos (aerênquima) entre os genótipos e sua influência na liberação de oxigênio ao longo da raiz, evidenciada pela avaliação indireta da formação da placa férrica. Estas duas variáveis determinam a quantidade de oxigênio que se difunde da atmosfera até às raízes e a quantidade liberada na rizosfera do arroz, necessário para a formação de nitrato nessa região. Embora não tenha sido possível identificar diretamente e/ou quantificar a nitrificação na rizosfera, a avaliação do nitrato transportado no xilema e a expressão dos genes são conclusivos ao indicar que houve nitrato disponível no solo alagado e que o mesmo contribui para o suprimento de N para o arroz. De um modo geral, foi observada uma relação entre o volume de aerênquima, a oxidação do ferro e a quantidade de nitrato translocado na seiva do xilema, sugerindo que a formação de nitrato é variável com a quantidade de oxigênio liberada na

rizosfera e, desta forma, pode ser um aspecto a ser considerado na busca de genótipos que possam absorver a forma nítrica com mais eficiência. Entretanto, deve-se considerar também, a importância da intensidade da perda de oxigênio pelas raízes nesse processo. Desta forma, além das observações do presente trabalho, faz-se necessário estudar aspectos relacionados com a permeabilidade das raízes para definir a magnitude de cada um dos fatores que influenciam na liberação do oxigênio e a relação com a nitrificação na rizosfera do arroz e, principalmente, com as informações já obtidas podem ser utilizadas na seleção de genótipos mais eficientes em absorver e aproveitar o N fornecido.

De maneira semelhante, houve relação positiva entre a quantidade de nitrato translocado no xilema e o acúmulo de mRNA do gene *OsNRT1.1*, indicando que a quantidade de nitrato formada na rizosfera ou na superfície oxidada do solo tem relação com o aumento da expressão deste gene. Entretanto, esta foi uma avaliação pontual da absorção e da expressão dos genes NRTs e não indica, de forma conclusiva, os genótipos mais eficientes em absorver nutrientes; somente aponta as concentrações de nutrientes no solo no momento da coleta e sua possível relação com a nitrificação na rizosfera. Para isso, seria necessário considerar também outros fatores, tais como a taxa de transpiração da planta, a dimensão do sistema radicular, entre outros, assim como fazer um monitoramento da absorção e expressão dos genes em dias e horários sucessivos, visando avaliar a variação nos teores de nutrientes na seiva ao longo do tempo.

Embora o trabalho não tenha sido conclusivo quanto à diferença na expressão entre os genótipos para o gene *OsNRT2.1*, a sua quantificação deve ser melhor estudada a fim de ajustar a metodologia para o método do RT-*q*PCR. A importância de se buscar o esclarecimento da expressão dos genes do grupo dos NRT2s está na sua importância na contribuição na absorção de N para o arroz, pois para Araki & Hasegawa (2006), os genes *OsNRT2.1* e *OsNRT2.2* são apontados como os mais importantes para a absorção de nitrato, principalmente em concentrações na faixa micromolar, o que confere as mesmas, uma grande importância em programas de melhoramento que visem obter plantas eficientes em absorver nitrogênio, principalmente em condições de baixa disponibilidade de N.

É importante ressaltar que a avaliação da expressão dos genes *OsNRT2.1* e *OsNRT1.1* neste trabalho, teve um caráter exploratório, ou seja, teve como principal objetivo identificar se haveria a ocorrência da expressão desses genes nos diferentes genótipos em condições de solo alagado e, desta forma, mostrar que o nitrato contribui efetivamente na nutrição nitrogenada do arroz. A partir desses resultados preliminares sobre o assunto, cria-se a necessidade de aprimorar os conhecimentos, no sentido de testar alternativas, com auxílio da biotecnologia, que visem aumentar a expressão desses genes e, com isso, melhorar a eficiência de absorção do nitrato.

Estudos como os de Katayama et al. (2009) apontam resultados promissores no aumento na absorção de nitrogênio em plantas transgênicas de arroz que receberam uma cópia adicional do gene *OsNRT2.1* fusionada ao promotor 35S, comparadas a plantas sem a inserção. A identificação de variação nos padrões de expressão desses genes em genótipos de arroz cultivados na região sul do Brasil, indica a possibilidade de explorar a técnica de superexpressão com objetivo de aumentar a eficiência da aquisição de nitrogênio pelas plantas, mesmo em condições de baixa disponibilidade deste nutriente no solo. Com isso, estudos podem ser desenvolvidos para obter informações importantes na busca do melhor aproveitamento de fertilizantes e, ainda, reduzir as doses aplicadas, reduzindo os custos com fertilizantes e a poluição ambiental.

Embora resultados promissores apontem que a maior expressão dos *OsNRTs* possam aumentar a capacidade de absorção de nitrogênio (Xu et al., 2009), é também fundamental aprimorar características relacionadas à assimilação desse nutriente. Hasegawa, (1996); Hasegawa et al. (1992); Ichii et al. (1993) e Sato et al. (1997) têm trabalhado no sentido de identificar mutantes de arroz defeituosos na absorção e na assimilação de N. A maioria dos mutantes estudados indicou deficiências ou limitações na atividade da enzima nitrato redutase (NR) ou na eficiência das H<sup>+</sup>-ATPases, que promovem o gradiente de prótons necessários para impulsionar a absorção de nitrato. Krapp et al. (1998) citam que, após absorver nitrogênio efetivamente, a assimilação foi limitante, sendo detectado que a atividade da enzima nitrato redutase torna-se limitada e, portanto, impede melhorias mais significativas no processo de aproveitamento eficiente do N aplicado.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICHEQUER, A. D. **Morfologia e distribuição de raízes de arroz irrigado por inundação e sua relação com a absorção de nutrientes e o rendimento de grãos**. 2004. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Guide to performing relative quantitation of gene expression using Real-Time quantitative PCR**. 2004. Disponível em: <<http://www.appliedbiosystems.com/absite/us/en/home/applications-technologies/real-time-pcr.html>>. Acesso em: jan. 2011.

ARAKI, R.; HASEGAWA, H. Expression of rice (*Oryza sativa* L.) genes involved in high-affinity nitrate transport during the period of nitrate induction. **Breeding Science**, Tokyo, v. 56, n. 3, p. 295-302. 2006.

ARMSTRONG, W. Aeration in higher plants. **Advances in Botanical Research**, San Diego, v. 7, n. 2, p. 225–332, 1979.

ARMSTRONG, W. Radial oxygen losses from intact rice roots as affected by distance from the apex, respiration, and waterlogging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 192–197, 1971.

ARMSTRONG, J.; ARMSTRONG, W. Rice: sulfide-induced barriers to root radial oxygen loss, Fe<sup>2+</sup> and water uptake, and lateral root emergence. **Annals of Botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 625-638, 2005.

ARMSTRONG, W. et al. Oxygen distribution in wetland plant roots and permeability barriers to gas-exchange with the rhizosphere: a microelectrode and modeling study with *Phragmites australis*. **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 687–703. 2000.

AULAKH, M. S. Pattern and amount of aerenchyma relate to variable methane transport capacity of different rice cultivars. **Plant Biology**, New York, v. 2, n. 1, p. 182–194, 2000.

AZAMBUJA, I. H. V. Aspectos sócio-econômicos da produção do arroz. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p 23-44.

BARBIER-BRYGOO, H. et al. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 62, n. 1, p. 1–27, 2011.

BARTA, A. L. Transport and distribution of  $^{14}\text{CO}_2$  assimilate in *Lolium perenne* in response to varying nitrogen supply to halves of a divided root system. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 38, n. 1, p. 48-52, 1976.

BARTLETT, R. J.; JAMES, B. R. Redox chemistry of soil. **Advances in Agronomy**, New York, v. 50, n. 1, p. 151-208, 1993.

BAUER, G. A.; BERNTSON, G. M. Ammonium and nitrate acquisition by plants in response to elevated  $\text{CO}_2$  concentration: The roles of root physiology and architecture. **Tree Physiology**, Victoria, v. 21, n. 2, p. 137–144, 1999.

BEGG, C. B. M. et al. Root-induced iron oxidation and pH changes in the lowland rice rhizosphere. **New Phytologist**, New York, v. 128, n. 3, p. 469 – 477. 1994.

BEDFORD, B. L.; BOULDIN, D. R.; BELIVEAU, B. D. Net oxygen and carbon dioxide balances in solutions bathing roots of wetland plants. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 943–959. 1991.

BLOOM, A. J.; SUKRAPANNA, S. S.; WARNER, R. L. Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, n. 4, p. 1294-1301, 1992.

BOXMAN, A. W. et al. Effects of ammonium and aluminum on the development and nutrition of *Pinus nigra* in hydroculture. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 73, n. 2, p.119–136, 1991.

BRIONES JÚNIOR, A. M. Ammonia-oxidizing bacteria on root biofilms and their possible contribution to N use efficiency of different rice cultivars. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 250, n. 2, p. 335–348, 2003.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J. Plant nitrogen transport and its regulation in changing soil environments. **Journal of Crop Improvement**, Binghamton v. 15, n. 1, p. 1-23, 2005.

BRITTO, D. T.; KRONZUCKER, H. J.  $\text{NH}_4^+$  toxicity in higher plants: A critical review. **Journal of Plant Physiology**, Villengang, v. 159, n. 6, p. 567-584, 2002.

BRITTO, D. T. et al. Futile transmembrane  $\text{NH}_4^+$  cycling: A cellular hypothesis to explain ammonium toxicity in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 7, p. 4255–4258, 2001.



BURESH, R. J.; SAMSON, M. I.; De DATTA, S. K. Quantification of denitrification in flooded soils as affected by rice establishment method. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 843 – 848. 1993.

CAO, W.; TIBBITS, T. W. Response of potatoes to nitrogen concentrations differ with nitrogen forms. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 4, p. 615 – 623, 1998.

CAMARGO, F. A. O.; SANTOS, G. A.; ROSSIELLO, R. O. P. Produção de ácidos orgânicos voláteis pela planta de arroz sob condições anaeróbias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, p. 337-342, 1993a.

CAMARGO, F. A. O., SANTOS, G. A., ROSSIELLO, R. O. P. Efeito dos ácidos acético e butírico sobre o crescimento de plântulas de arroz. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 1011-1018, 1993b.

CEREZO, M. Major alterations of the regulation of root NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake are associated with the mutation of *NRT2.1* and *NRT2.2* genes in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, n. 1, p. 262-271. 2001.

CHAILLOU, S. et al. Expression of characteristics of ammonium nutrition as affected by pH of the root medium. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 235, p. 189-196, 1991.

CHAILLOU, S. et al. Compared effects of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup> on growth and metabolism of French bean. **Physiologie Vegetale**, Paris, v. 24, n. 6, p. 679–687, 1986.

CHEN, F. R. et al. Response of rice (*Oryza sativa*) with root surface iron plaque under aluminium stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 98, n. 2, p. 389-395. 2006.

CHEN, C. C.; DIXON, J. B.; TURNER, F. T. Iron coatings on rice roots: Morphology and models of development. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 44, n. 5, p. 1113-1119, 1980.

CLARK, L. H.; HARRIS, W. H. Observations on the root anatomy of rice (*Oryza sativa* L.). **American Journal of Botany**, St. Louis, v. 68, n. 1, p. 154–161, 1981.

CLAASEN, M. E. T; WILCOX, G. E. Effect of nitrogen form on growth and composition of tomato and pea tissue. **Journal of American Society Horticulture Science**, Alexandria, v. 99, n. 1, p. 171 – 174, 1974.

COLMER, T. D. Long-distance transport of gases in plants: A perspective on internal aeration and radial oxygen loss from roots. **Plant, Cell and Environment**, United Kingdom, v. 26, n. 1, p. 17–36, 2003.

COUNCE, P. A.; KEISLING, T. C.; MITCHELL, A. A uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. **Crop Science**, Madison, v. 40, n. 2, p. 436-443, 2000.

CORUZZI, G.; BUSH, D. R. Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 125, n. 1, p. 61-64, 2001.

COX, W. J.; REISENAUER, H. M. Growth and ion uptake by wheat supplied with nitrogen as nitrate, or ammonium, or both. **Plant Soil**, The Hague, v. 38, n. 3, p. 363–380, 1973.

CRAMER, M. D.; LEWIS, O. A. M. The influence of nitrate and ammonium nutrition on the growth of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) plants. **Annals of Botany**, London, v. 72, n. 4, p. 359-365, 1993.

CRAWFORD, N. M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 859-868. 1995.

CRAWFORD, N. M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 3, n. 10, p. 389-395, 1998.

CRESTANA, S. Avaliação da distribuição de raízes no solo auxiliada por processamento de imagens digitais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 365-371, 1994.

De DATTA, S. K.; BURESH, R. J. Integrated nitrogen management in irrigated rice. **Advances in Soil Science**, New York, v. 10, n. 1, p. 143 – 169. 1989.

De GRAAF, M. C. C. et al. Differential effects of ammonium and nitrate on three heathland species. **Plant Ecology**, Netherlands, v. 135, n. 2, p. 185-196, 1998.

DENG, R. L. et al. Characterization, function and expression analysis of ammonium transporter gene OsAMT1.4 and OsAMT5 in rice (*Oryza sativa*). **Science of Agriculture Sinica**, Beijing, v. 40, n. 11, p. 2395 – 2402. 2007.

De SIMONE, O. et al. Apoplastic barriers and oxygen transport properties of hypodermal cell walls in roots from four Amazonian tree species. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, n. 2, p. 206–217. 2003.

DIBB, D. W.; THOMPSON, W. R. Interaction of potassium with other nutrients. In: MUNSON, R. D. **Potassium in Agriculture**. Madison: ASA-CSSA-SSSA, 1985. p. 515-533.

DUAN, Y. H. et al. Responses of rice cultivars with different nitrogen use efficiency to partial nitrate nutrition. **Annals of Botany**, Oxford, v. 99, n. 6, p. 1153-1160, 2007.

DUAN, Y. H. et al. Nitrate effect on rice growth and nitrogen absorption and assimilation at different growth stages. **Pedosphere**, Beijing, v. 16, n. 6, p. 707–717, 2006.

- DUARTE, F. M. **Perdas de nitrogênio por volatilização de amônia e eficiência da adubação nitrogenada na cultura do arroz irrigado**. 2006. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina. 2006. 401 p.
- ESSINGTON, M. E. **Soil and water chemistry: an integrative approach**. Boca Raton: CRC Press, 2005. 553 p.
- EVANS, D. E. Aerenchyma formation. **New Phytologist**, New York, v. 161, n. 1, p. 35-49. 2003.
- FRENEY, J. R. et al. Ammonia and nitrous oxide losses following applications of ammonium sulfate to flooded rice. **Australian Journal of Agriculture Research**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 37-45, 1981.
- FAN, X. et al. A comparison of nitrate transport in four different rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. **Science in China Series**, Beijing, v. 48, n. 2, p. 897-911, 2005.
- FORDE, B. G. Local and long-range signalling pathways regulating plant responses to nitrate. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, n. 1, p. 203-224, 2002.
- FORDE, B. G. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **BBA-Biomembranes**, Netherlands, v. 1465, n. 1-2, p. 219-235, 2000.
- FUKUMORITA, T.; CHINO, M. Sugar, amino acid, and inorganic contents in rice phloem sap. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 23, n. 2, p. 273-283, 1982.
- GALLAIS, A.; HIREL, B. An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. **Journal of experimental botany**, Oxford, v. 55, n. 396, p. 295-306, 2004.
- GAZZARRINI, S. et al. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 6, p. 937-947, 1999.
- GERENDAS, J. et al. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, Deerfield Beach, v. 160, n. 3, p. 239-251, 1997.
- GIGON, A.; RORISON, I. H. Response of some ecologically distinct plant species to nitrate-nitrogen and to ammonium-nitrogen. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 93-102, 1972.
- GLASS, A. D. M. et al. The regulation of nitrate and ammonium transport systems in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 855-864. 2002.

GLASS, A. D. M. et al. Nitrogen transport in plants, with emphasis on the regulation of fluxes to match plant demand. **Zeitschrift für Pflanzenernährung Bodenkunde**, Deerfield Beach, v. 164, n. 2, p. 199–207. 2001.

GLASS, A. D. M.; SIDDIQI, M. Y. Nitrogen absorption by plants roots. In: SRIVASTAVA, H. S.; SINGH, R. P.(Ed.) **Nitrogen nutrition in higher plants**. New Delhi: Associated Publishing, 1995. n. 1. p. 21-56.

GOOD, A. G.; SHRAWAT, A. K.; MUENCH, D. G. Can less yield more? Is reducing nutrient input into the environment compatible with maintaining crop production? **Trens in plant science**, New York, v. 9, n. 12, p. 597-605. 2004.

GREENWOOD, D. J. The effect of oxygen concentration on the decomposition of organic materials in soil. **Plant and Soil**, The Hague, v. 14, n. 4, p. 360-367, 1961.

GROOT, T. T. et al. Gas transport through the root-shoot transition zone of rice tillers. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 277, n. 1-2, p. 107-116, 2005.

GUY, J.; KIRK D. Rice root properties for internal aeration and efficient nutrient acquisition in submerged soils. **New Phytologist**, New York, v. 159, n. 1, p. 185-194, 2003.

GUNAWARDENA, A. et al. Characterization of programmed cells death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, New York, v. 212, v. 1, p. 205-214. 2001.

HARADA, T.; TAKAKI, H.; YAMADA, Y. Effect of nitrogen sources on the chemical components in young plants. **Soil Science of Plant Nutrition**, New York, v. 14, n. 1, p. 47 – 55, 1968.

HASEGAWA, H. Selection for mutants with low nitrate uptake ability in rice (*Oryza sativa*). **Physiology Plant**, Waterbury, VT, v. 96, n. 1, p. 199-204, 1996.

HASEGAWA, H. et al. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) mutant deficient in the heme domain of nitrate reductase. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 84, n. 1, p. 6-9, 1992.

HAYNES, R. J.; GOH, K. M. Ammonium and nitrate nutrition of plants. **Biology Reviews**, Cambridge, v. 53, p. 465–510, 1978.

HAYASHI, H.; CHINO, M. Chemical composition of phloem sap from the upper most internode of the rice plant. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 31, p. v. 1, 247-251, 1990.

HEBERER, J. A.; BELOW, F. E. Mixed nitrogen nutrition and productivity of wheat grown in hydroponics. **Annals of Botany**, London, v. 63, n. 6, p. 643–649, 1989.

HIROSE, N.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. Inducible accumulation of mRNA for NADH-dependent glutamate synthase in rice roots in response to ammonium ions. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 38, n. 11, p. 1295-1297, 1997.

HOLLDAMPF, B.; BARKER, A. V. Effects of ammonium on elemental nutrition of red spruce and indicator plants grown in acid soil. **Communications of Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 24, n. 15-16, p. 1945-1957, 1993.

HOSONO, T.; NOUCHI, I. The dependence of methane transport in rice plants on the root zone temperature. **Plant Soil**, Berlin, v. 191, n. 2, p. 233-240, 1997.

HOWELER, R. H. Root induced orange disease of rice in relation physico-chemical changes in a flooded oxisol. **Soil Science Society of American Proceedings**, Madison, v. 37, n. 6, p. 898-903. 1973.

ICHII, M.; KATAGIRI, T.; HASEGAWA, H. Mutants with low nitrate reductase activity selected from seedlings expressing nitrogen deficiency symptoms in rice (*Oryza sativa* L.). **Japonic Journal Breeding**, Tokyo, v. 43, n. 1, p. 123-127, 1993.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. Dados de safra. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br/dados.htm>>. Acesso em: 08 abr. 2010.

INSTITUTO RIO GRANDENSE DO ARROZ. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br/arquivos/20090508130654.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2009.

JACKSON, M. B. ethylene and responses of plants to soil waterlogging and submergence. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 36, n. 1, p. 145-174, 1985.

JACKSON, M.; ARMSTRONG, W. Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence. **Plant Biology**, New York, v. 1, n. 3, p. 274-287, 1999.

JEFFREE, C. E.; DALE, J. E.; FRY, S. C. The genesis of intercellular spaces in developing leaves of *Phaseolus vulgaris* L. **Protoplasma**, Berlin, v. 132, n. 1, p. 90-98, 1986.

JUGSUJINDA, A.; PATRICK Jr., W. H. Evaluation of toxic conditions associated with orangeing symptoms of rice in a flooded Oxisol in Sumatra, Indonesia. **Plant and Soil**, Rockville, v. 152, n. 2, p. 237-243, 1993.

JUSTIN, S. H. F. W.; ARMSTRONG, W. Evidence for the involvement of ethene in aerenchyma formation in adventitious roots of rice (*Oryza sativa* L.). **New Phytologist**, New York, v. 118, n. 1, p. 49-62, 1991.

KATAYAMA, H. et al. Production and characterization of transgenic rice plants carrying a high-affinity nitrate transporter gene (*OsNRT2.1*). **Breeding Science**, Tokyo, v. 59, n. 3, p. 237-243, 2009.

KIRK, G. J. D.; BAJITA, J. B. Root-induced iron oxidation, pH changes and zinc solubilization in the rhizosphere of lowland rice. **New Phytologist**, New York, v. 131, p. 129 – 137. 1995.

KIRK, G. J. D.; KRONZUCKER, H. J. The potential for nitrification and nitrate uptake in the rhizosphere of wetland plants: A modeling study. **Annals of botany**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 639-646, 2005.

KIRK, G. J. D. **The biogeochemistry of submerged soils**. Chichester, UK: Wiley, 2004.

KIRK, G. J. D. Rice roots properties for internal aeration and efficient nutrient acquisition in submerged soil. **New Phytologist**, New York, v. 159, n. 1, p. 185-194, 2003.

KIRK, G. J. D. Plant-mediated processes to acquire nutrients: Nitrogen uptake by rice plants. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 232, n. 1, p. 129–134, 2001.

KIRKBY, E. A. Influence of ammonium and nitrate nutrition on the cation-anion balance and nitrogen and carbohydrate metabolism of white mustard plants grown in dilute nutrient solutions. **Soil Science**, Philadelphia, v. 105, n. 3, p. 133–141, 1968.

KLEINER, D. The transport of  $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$  across biological membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 639, n.1, p. 41–52, 1981.

KLUDZE, H. K.; DeLAUNE, R. D. Straw application on methane and oxygen exchange and growth in rice. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 59, n. 3, p. 824-830, 1995.

KLUDZE, H. K.; DELAUNE, R. D.; PATRICK Jr., W. H. Aerenchyma formation and methane and oxygen exchange in rice. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 57, n. 2, p. 386–391, 1993.

KRAPP, A. et al. Expression studies of *NRT2:1 Np*, a putative high affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. **The Plant Journal**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 1051-1061, 1998.

KONCALOVA, H. Anatomical adaptations to waterlogging in roots of wetland graminoids: limitations and drawbacks. **Aquatic Botany**, Netherlands, v. 38, n. 1, p. 127–134, 1990.

KOTULA, L.; STEUDLE, E. Measurements of oxygen permeability coefficient of rice (*Oryza sativa* L.) roots using a new perfusion technique. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 567–580, 2009.

KOTULA, L. Z. et al. Functional and chemical comparison of apoplastic barriers to radial oxygen loss in roots of rice (*Oryza sativa* L.) grown in aerated or deoxygenated solution. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 2155-2167, 2009.

KOSEGARTEN, H. et al. Differential ammonia-elicited changes of cytosolic pH in root hair cells of rice and maize as monitored by 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5 and (-6)-carboxyfluorescein-fluorescence ratio. **Plant Physiology**, Rockville, v. 113, n. 2, p. 451–461, 1997.

KRONZUCKER, H. J. et al. Ammonium toxicity and the real cost of transport. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 8, p. 335-337, 2001.

KRONZUCKER, H. J. et al. Comparative kinetic analysis of ammonium and nitrate acquisition by tropical lowland rice: Implications for rice cultivation and yield potential. **New Phytologist**, New York, v.145, n. 3, p. 471-476, 2000.

KRONZUCKER, H. J. et al. Nitrate-ammonium synergism in rice: A subcellular flux analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 119, n. 3, p. 1041-1045, 1999.

KRONZUCKER, H. J.; SIDDIQI, M. Y.; GLASS, A. D. M. Kinetics of  $\text{NH}_4^+$  influx in spruce. **Plant Physiology**, Rockville, v. 110, n. 3, p. 773–779, 1996.

LI, B. Z. et al. Molecular Basis and Regulation of Ammonium Transporter in Rice. **Rice Science**, China, v.16, n. 4, p. 314 – 322, 2009.

LI, Y. L. et al. Contribution of nitrification happened in rhizospheric soil growing with different rice cultivars to N nutrition. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 43, n. 4, p. 417–425, 2006.

LIAO, Z.; WOODARD, H. J.; HOSSNER, L. R. The relationship of soil and leaf nutrients to rice leaf orangeing. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 17, n. 10, p. 1781–1802, 1994.

LIVAC, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  method. **Methods**, New York, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LIN, C.M. et al. Cloning and functional Characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, *OsNRT1*, from rice. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 2, p. 379–388, 2000.

LINDSAY, W. L. **Chemical equilibria in soils**. New York: J. Wiley & Sons, 1979. 449 p.

LIPS, S. H.; LEIDI, E. O.; SILBERBUSH, M. Nitrogen assimilation of plants under stress and high  $\text{CO}_2$  concentrations. In: **INORGANIC nitrogen metabolism**. Berlin: Springer-Verlag, 1990. p. 341-380.

LIESACK, W.; SCHNELL, S.; REVSBECH N. P. Microbiology of flooded rice paddies. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, p. 625–645, 2000.

LIU, K. H.; HUANG, C. Y.; TSAY, Y. F. CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. **Plant Cell**, Rockville, v. 11, n. 5, p. 865-874, 1999.

LOPES, S. I. G.; VOLKWEISS, S. J.; TEDESCO, M. J. Desenvolvimento do sistema radicular do arroz irrigado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 273-278, 1994.

LOPES, S. I. G. **Eficiência da adubação potássica e distribuição radicular no arroz irrigado**. 1991. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

LUXMOORE, R. J.; STOLZY, L.; LETEY, J. Oxygen diffusion in the soil plant system. **Agronomy Journal**, Madison, v. 62, n. 2, p. 317-322, 1970.

MÄCK, G.; TISCHNER, R. Constitutive and inducible net  $\text{NH}_4^+$  uptake of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, München, v. 144, n. 2, p. 351-357, 1994.

MAGALHAES, J. S.; WILCOX, G. E. Tomato growth and mineral composition as influenced by nitrogen form and light intensity. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 6, n. 11, p. 847-862, 1983.

MATSUO, T.; HOSHIKAWA, K. **Science of the rice plant: I. morphology**. Tokyo: Food and Agriculture Policy Research Center, 1993.

MISTRİK, I.; ULLRICH, C. I. Mechanism of anion uptake in plant roots: Quantitative evaluation of  $\text{H}^+/\text{NO}_3^-$  and  $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  stoichiometries. **Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 34, n. 5, p. 629-636, 1996.

MORAES, J. F. V., DYNIA, J. F. Alterações nas características químicas e físico-químicas de um solo gley pouco húmico sob inundação e após drenagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 223-235, 1992.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, 2002. 623 p.

MURPHY, A. T.; LEWIS, O. A. M. Effect of nitrogen feeding source on the supply of nitrogen from root to shoot and the site of nitrogen assimilation in maize (*Zea mays* L. cv. R201). **New Phytologist**, New York, v. 107, n. 2, p. 327-333, 1987.

NAVA, G. **Oxidação do ferro em raízes de duas cultivares de arroz em solução de solo inundado**. 1997. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

NAVA, G.; BOHNEN, H. Oxidação de ferro de dois cultivares de arroz em solução de solo inundado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 2, p. 325-332, 2002.



NINNEMANN, O.; JAUNIAUX, J. C.; FROMMER, W. B. Identification of high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. **EMBO Journal**, Oxford, v. 13, n. 15, p. 3464-3471, 1994.

OAKS, A. A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. **Bioscience**, Washington, v. 42, n. 2, p. 103-111, 1992.

OKAMOTO, M.; VIDMAR, J. J.; GLASS, A. D. M. Regulation of NRT1 and NRT2 gene families of *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate provision. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.44, n. 2, p. 304-317, 2003.

OLIVEIRA, C., LEAL, J. R., VELLOSO, A. C. X. Processos redox em glei húmico do Estado do Rio de Janeiro: IV. Variação no "status redox" (pe+pH) de solos cultivados com arroz alagado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p. 35-39, 1993.

PATRICK Jr, W. H.; STURGIS, M. B. Concentration and movement of oxygen as related to absorption of ammonium and nitrate nitrogen by rice. **Soil Science Society of American Proceedings**, Madison, v. 19, n. 1, p. 59-62, 1955.

PINTO, L. F. S. et al. Caracterização dos solos de várzea. In: GOMES, A.S.; PAULETTO, E. A. (Ed.). **Manejo do solo e da água em áreas de várzea**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1999. p. 11-36.

PONNAMPERUMA, F. N. The chemistry of submerged soils. **Advances in Agronomy**, New York, v. 24, n. 1, p. 29-96, 1972.

RAO, D. N.; MIKKELSEN, D. S. Effect of rice straw additions on production of organic acids in a flooded soil. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 47, n. 2, p. 303-311, 1977.

REDDY, K. S.; MENARY, R. C. nitrate reductase and nitrate accumulation in relation to nitrate toxicity in *Boronia megastigma*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 78, n. 4, p. 430-434, 1990.

REDDY, K. S.; De LAUNE, R. D. **Biogeochemistry of wetlands**: science and applications. Boca Raton: CRC Press, 2008. 806 p.

REVSBECH, N. P. et al. Microsensor analysis of oxygen and pH in the rice rhizosphere under field and laboratory conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 29, n. 4, p. 379–385, 1999.

SATO, H. et al. Reduced level of NADH-dependent nitrate reductase activity in rice mutant M819 due to deletion of a valine residue in heme domain. **Breeding Science**, Tokyo, v. 47, p. n. 1, 115-120, 1997.

SAVANT, N. K.; DeDATTA, S. K. Nitrogen transformations in wetland rice soils. **Advances in agronomy, San Diego**, v. 35, n. 1, p. 241-302, 1982.

SCHJOERRING, J. K. et al. The regulation of ammonium translocation in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 883-890, 2002.

SIDDIQI, M. Y. et al. Studies of the uptake of nitrate in barley. 1. Kinetics of  $^{13}\text{NO}_3^-$  - influx. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 4, p. 1426-1432, 1990.

SILVA, L. S.; BOHNEN, H. Rendimento e acúmulo de nutrientes pelo arroz em solução nutritiva com e sem adição de silício. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 771-777, 2001.

SMET, I. De.; ZHANG, H.; BEECKMAN, T. A novel role for abscisic acid emerges from underground. **Trends in Plant Science**, London, v. 11, n. 9, p. 434-438, 2006.

SOCIEDADE BRASILEIRA DO SOLO. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS-Núcleo Regional Sul, 2004. 400 p.

SOHLENKAMP, C. et al. Characterization of Arabidopsis *AtAMT2*, a novel ammonium transporter in plants. **FEBS Letter**, Heidelberg, v. 467, p. 273 – 278, 2000.

SOSBAI. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 5., 2007, Pelotas; REUNIÃO DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 27. Pelotas: SOSBAI, 2007. 161 p.

SOSBAI. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o sul do brasil. In: REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 28., 2010, Bento Gonçalves. Cachoeirinha: SOSBAI, 2010. 188 p.

SOUKUP, A. et al. Apoplastic barriers to radial oxygen loss and solute penetration: a chemical and functional comparison of the exodermis of two wetland species, *Phragmites australis* and *Glyceria maxima*. **New Phytologist**, New York, v. 173, n. 2, p. 264–278, 2007.

SOUSA, R. O.; GOMES, A. S.; VAHL, L. C. Toxidez por ferro em arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa. Informação Tecnológica, 2004. p 305-337.

SPEER, M.; KAISER, W. M. Replacement of nitrate by ammonium as the nitrogen source increases the salt sensitivity of pea plants. 2. Intercellular and intracellular solute compartmentation in leaflets. **Plant, Cell and Environment**, United Kingdom, v. 17, n. 11, p. 1223-1231, 1994.

SORRELL, B. K.; et al. Ecophysiology of wetland plant roots: A modelling comparison of aeration in relation to species distribution. **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, n. 3, p. 675–685, 2000.

STAINER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBAREG, E. A. Principais tipos de metabolismo microbiano. In: MUNDO dos micróbios. São Paulo: Edgar Blücher, 1969. p. 251-298.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: EMATER/RS, 2008. 222 p.

STOLZY, L. H. Soil atmosphere. In: CARSON, E. W. (Ed). **The plant root and its environment**. Charlottesville: University Press of Virginia, 1974. p. 335-355.

SUENAGA, A. et al. Constitutive expression of a novel-type ammonium transporter *OsAMT2* in rice plants. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 206–211. 2003.

TAIZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKEI, K. et al. Multiple routes communicating nitrogen availability from roots to shoots: A signal transduction pathway mediated by cytokinin. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 370, p. 971-977, 2002.

TANAKA, A.; NAVASERO, S. A. Growth of the rice plant on acid sulfate soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 12, n. 1, p. 107-114, 1966.

TANAKA, A.; LOE, R.; NAVASERO, S. A. Some mechanisms involved in the development of iron toxicity symptoms in the rice plant. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 12, n. 1, p. 158-164, 1966.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, planta e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. (Boletim técnico, 5).

TERRES, A. L. S. et al. Melhoramento genético e cultivares de arroz irrigado. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES JÚNIOR, A. M. **Arroz irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p 161-235.

TINKER, P. B.; NYE, P. H. **Solute movement in the rhizosphere**. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. 464 p.

THOMSON, C. J. et al. Aerenchyma formation and associated oxygen movement in seminal and nodal roots of wheat. **Plant, Cell and Environment**, United Kingdom, v. 13, n. 4, p. 395–403, 1990.

TOBIN, A. K.; YAMAYA, T. Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 356, p. 591-604, 2001.

TOURAINÉ, B.; DANIEL-VEDELE, F.; FORDE, B. G. Nitrate uptake and its regulation. In: LEA, J. P.; MOROT-GAUDRY, J. F. (Ed.). **Plant nitrogen**. Berlin-Heidelberg: INRA Editions and Springer-Verlag, 2001. p.1-36.

TROELSTRA, S. R.; WAGENAAR, R.; SMANT, W. Nitrogen utilization by plant species from acid heathland soils. 1- Comparison between nitrate and ammonium nutrition at constant low pH. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 1103–1112, 1995.

- VAHL, L. C.; SOUSA, R. O. Aspectos físico-químicos de solos alagados. In: GOMES, A. S.; MAGALHÃES Jr, A.. (Org.). **Arroz Irrigado no Sul do Brasil**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. p. 97-118.
- VAUGHN, K. C.; CAMPBELL, W. G. Immunogold localization of nitrate reductase in maize leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 88, n. 4, p. 1354-1357, 1988.
- VELLOSO, A. C. X.; OLIVEIRA, C.; LEAL, J. R. Processos redox em glei húmico do Estado do Rio de Janeiro: I. Variação das concentrações de Fe (II) e fosfato. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 27-34, 1993.
- VIDMAR, J. J. et al. Isolation and characterization of *HvNRT2.3* and *HvNRT2.4*, cDNAs encoding high-affinity nitrate transporters from roots of barley. **Plant Physiology**, Rockville, v. 122, n. 3, p. 783-318. 2000.
- VON WIRÉN, N. et al. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. **Plant Journal**, London, v. 21, n. 1, p. 167–175. 2000.
- XU, Z. et al. Characterization of promoter expression patterns of *OsNRT2.1*, a nitrate transporter gene of rice (*Oryza sativa* L.). **Frontiers of Agriculture in China**, Beijing, v. 3, n. 4, p. 402-412. 2009.
- WANG, R.; CRAWFORD, N. M. Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 17, p. 9297-9301. 1996.
- WANG, R.; LIU, D.; CRAWFORD, N. M. The *Arabidopsis* CHL1 protein plays a major role in high-affinity nitrate uptake. **Proceedings of National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 25, p. 15134–15239. 1998.
- WANG, M. Y. et al. Ammonium uptake by rice roots. I. Kinetics of  $^{13}\text{NH}_4^+$  influx across the plasmalemma. **Plant Physiology**, Rockville, v. 103, n. 4, p. 1259–1267, 1993.
- WANG, M. Y. et al. Ammonium uptake by rice roots. II. Electrophysiology. **Plant Physiology**, Rockville, v. 104, n. 3, p. 899–906, 1994.
- WANG, X. T.; BELOW, F. E. Cytokinins in enhanced growth and tillering of wheat induced by mixed nitrogen source. **Crop Science**, Madison, v. 36, n.1, p. 121–126, 1996.
- WILLIAMS, L. E.; MILLER, A. J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review in Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 52, n. 1, p. 659-688, 2001.
- WOLT, J. D. **Soil solution chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1994.

WOOLHOUSE, H. W.; HARDWICK, K. The growth of tomato seedlings in relation to the form of the nitrogen supply. **New Phytologist**, New York, v. 65, n. 4, p. 518–526, 1966.

YAMAYA, T. et al. A Supply of nitrogen causes increase in the level of NADH-dependent glutamate synthase protein and in the activity of the enzyme in roots of rice seedlings. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 36, n. 7, p. 1197-1204, 1995.

YOSHIDA, T. Microbial metabolism of flooded soils. **Soil Biochemistry**, New York, v. 3, p. 83-122, 1975.

ZHU, Z. et al. Different tolerance to light stress in  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  grown *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 2, n. 5, p. 558-570, 2000.

ZHUO, D. et al. Regulation of putative high-affinity nitrate transporter (*Nrt2;1At*) in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Journal**, London, v. 17, n. 5, p. 563-568, 1999.