

Análise da Expressão das Isoformas de H⁺-ATPase de Membrana Plasmática em Raízes e Parte Aérea de Arroz

Hellen Oliveira ¹; Marcus Vinícius Loss Sperandio ² & Sonia Regina de Souza

1. Bolsista PIBIC, Discente do Curso de Agronomia, Departamento de Solos/UFRRJ; 2. Doutor em Agronomia/Ciência do Solo/UFRRJ; 3. Professora Associada IV Depto Química/UFRRJ.

Palavras-chave: Bomba de próton; PCR em Tempo Real; *Oryza sativa*.

Introdução

A eficiência de uso de N pode ser dividida em diversos fatores: eficiência de absorção, eficiência de assimilação e eficiência de remobilização. Em solos de baixa fertilidade, a eficiência de absorção é fator chave para a eficiência de uso. A absorção também de nutrientes também depende do gradiente eletroquímico entre o apoplasto e o citossol. A enzima responsável pela criação do gradiente eletroquímico é a H⁺-ATPase localizada na membrana plasmática (PM H⁺-ATPase).

A PM H⁺-ATPase possui dez isoformas em arroz (*OsA1-OsA10*), sendo *OsA2* e *OsA7* as isoformas mais expressas e também induzidas pelo fornecimento com NO₃⁻ (SPERANDIO et al., 2011). Desse modo, é necessário maior entendimento da função de isoformas específicas de PM H⁺-ATPase entre raiz e parte aérea. Por sua função de extrema importância em toda a planta, a PM H⁺-ATPase é chamada de enzima mestre do metabolismo vegetal.

Desse modo, o objetivo do presente trabalho é avaliar as diferenças de expressão entre as isoformas de PM H⁺-ATPase na parte aérea e raiz de arroz, comparando com os bancos de dados de fragmentos expressos do banco de dados "NCBI Unigene".

Metodologia

Foram usadas plantas de arroz da variedade Nipponbare, cultivadas em câmara de crescimento com 500 µmoles de fótons fotossintetizantes m⁻² s⁻¹, 70% de umidade relativa e fotoperíodo de 14h/10h (dia/noite). As plantas foram acondicionadas em potes de 700mL com solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND e ARNON, 1950) modificada com 2 mM de N-NO₃⁻. A solução teve o pH ajustado para 5,5 e foi trocada a cada três dias. Aos 21 dias após a germinação (DAG) as plantas foram divididas em parte aérea e raiz, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C. A extração de RNA total foi feita de acordo com GAO et al. (2001). Para o tratamentos com DNase, foi usado o kit "Amplification Grade DNase I" da Sigma, enquanto a síntese de cDNA foi usado o kit "High Capacity RNA-to-cDNA Kit" da Life Technologies. O tratamento com DNAase e síntese de cDNA foi feita de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de PCR em tempo real foi feita utilizando o kit "SYBR® Green PCR Master Mix" (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante usando a sequência de iniciadores de acordo com SPERANDIO et al. (2011). O perfil de EST (expressed sequence tag) foi obtido no banco de dados "NCBI Unigene" para arroz (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/UGOrg.cgi?TAXID=4530>).

Resultados e Discussão

As isoformas *OsA4*, *OsA6*, *OsA9* e *OsA10* não foram expressas nas condições do experimento (Figura 1). As isoformas *OsA6* e *OsA10* pertencem à subfamília IV e *OsA9* pertence a subfamília III, que apresentam expressão reduzida ou específica em determinados estágios de crescimento (BAXTER et al., 2003). Por exemplo, em *Arabidopsis* *OsA10* é expresso em panículas de arroz durante o estágio de florescimento (BAXTER et al., 2003). ZHU et al. (2009) e CHANG et al. (2009) também não verificaram a expressão das isoformas *OsA9* e *OsA10* em arroz.

As isoformas *OsA1*, *OsA2* e *OsA3* são mais expressas na parte aérea, enquanto *OsA7* é mais expressa nas raízes (Figura 1).

As isoformas de PM H⁺-ATPase são expressas de maneira distinta entre raiz e parte aérea. Somente as isoformas *OsA5* e *OsA8* não possuem expressão diferenciada entre raiz e parte aérea (Figura 1). De acordo com CHANG et al. (2009) *OsA8* é mais expressa na raiz em relação à parte aérea, o que pode ser provocado pelo diferente modelo experimental usado por CHEN et al. (2009), que avaliou a expressão da PM H⁺-ATPase em resposta à deficiência de P, enquanto no presente experimento as plantas foram cultivadas sem privação deste nutriente.

A análise no banco de dados "NCBI Unigene" mostra que *OsA2* e *OsA7* são as isoformas de PM H⁺-ATPase mais expressas, desse modo, *OsA2* é a isoforma mais expressa na parte aérea enquanto *OsA7* é a isoforma mais expressa na raiz.

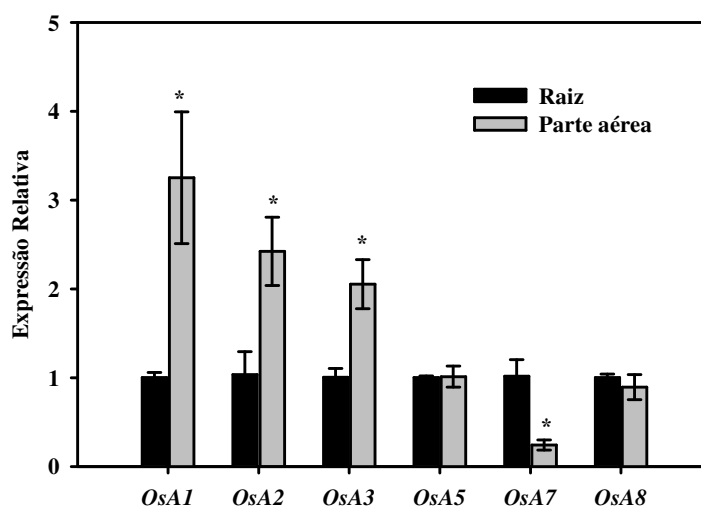


Figura 1. Expressão das isoformas de PM H⁺-ATPase nas raízes e parte de arroz da variedade Nipponbare crescidas com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO₃⁻. * indica diferença entre raiz e parte aérea pelo teste F (P<0,05).

Conclusões

As isoformas de PM H⁺-ATPase apresentam regulação diferenciada entre raiz e parte aérea de arroz. As isoformas *OsA2* e *OsA7* são as principais entre as dez isoformas de PM H⁺-ATPase, desse modo, cada isoforma é mais expressa em cada parte da planta.

Referências Bibliográficas

- BAXTER, I.; TCHIEU, J.; SUSSMAN, M. R.; BOUTRY, M.; PALMGREN, M. G.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J. F.; AXELSEN, K. B. Genomic comparison of P-type ATPase ion pump in Arabidopsis and rice. **Plant Physiology**, v.132, p.618-628, 2003.
- CHANG, C.; HU, Y.; SUN, S.; ZHU, Y.; MA, G.; XU, G. Proton pump *OsA8* is linked to phosphorus uptake and translocation in rice. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 557–565, 2009.
- GAO, J., LIU, J., LI, B., LI, Z. Isolation and Purification of Functional Total RNA from Blue-grained Wheat Endosperm Tissues Containing High Levels of Starches and Flavonoids. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 19, p. 185a – 185i, 2001.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Stn. Bull*, v.347, p.1-32, 1950.
- SPERANDIO, M. V. L.; SANTOS, L. A.; BUCHER, C. A.; FERNANDES, M. S.; SOUZA, S. R. Isoforms of plasma membrane H⁺-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO₃⁻ or NH₄⁺. **Plant Science**, v. 180, p. 251-258, 2011.

ZHU, Y.; DI, T.; XU, G. CHEN, X.; ZENG, H.; YAN, F.; SHEN, Q. Adaptation of plasma membrane H⁺-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. **Plant, cell & environment**, v. 32, p. 1428-1440, 2009.