

# Análise da Expressão das Isoformas de H<sup>+</sup>-ATPase de Membrana Plasmática em Raízes e Parte Aérea de Arroz

Hellen Oliveira <sup>1</sup>; Marcus Vinícius Loss Sperandio <sup>2</sup> & 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<sup>+</sup>-ATPase localizada na membrana plasmática (PM H<sup>+</sup>-ATPase).

A PM H<sup>+</sup>-ATPase possui dez isoformas em arroz (*OsA1-OsA10*), sendo *OsA2* e *OsA7* as isoformas mais expressas e também induzidas pelo fornecimento com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (SPERANDIO et al., 2011). Desse modo, é necessário maior entendimento da função de isoformas específicas de PM H<sup>+</sup>-ATPase entre raiz e parte aérea. Por sua função de extrema importância em toda a planta, a PM H<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-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<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 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-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. 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>).

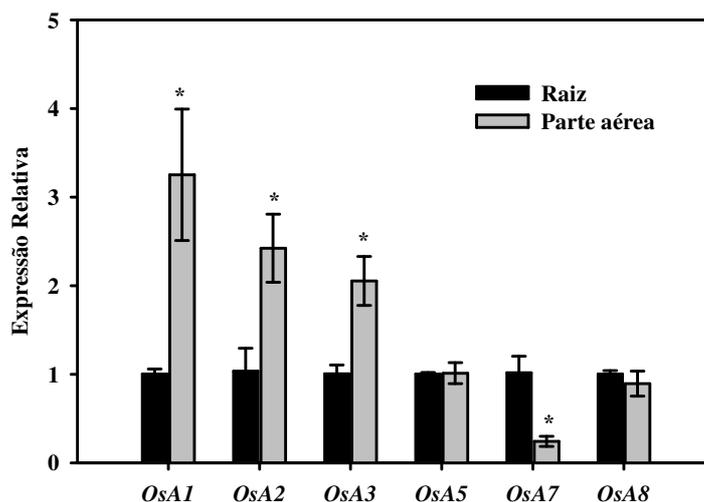
## Resultados e Discussão

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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-ATPase nas raízes e parte de arroz da variedade Nipponbare crescidas com suprimento constante de 2,0 mM de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. \* indica diferença entre raiz e parte aérea pelo teste F (P<0,05).

### Conclusões

As isoformas de PM H<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-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<sup>+</sup>-ATPase in rice root and shoot are differentially induced by starvation and resupply of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> or NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. **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<sup>+</sup>-ATPase of rice roots to low pH as related to ammonium nutrition. **Plant, cell & environment**, v. 32, p. 1428-1440, 2009.