

Avaliação da expressão de transportadores de amónio em pereira ‘Rocha’ enxertada em marmeleiro ‘BA29’ em resposta à fertilização azotada

Mariana Mota, Cláudia Neto & Cristina M. Oliveira

Secção de Horticultura, Departamento de Produção Agrícola e Animal, Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1349-017, Lisboa, Portugal, mariana@isa.utl.pt, claudia.neto@netvisao.pt, crismoniz@isa.utl.pt

Resumo

Para estudar o papel dos transportadores de amónio na nutrição azotada de pereiras ‘Rocha’ enxertadas em marmeleiro ‘BA29’, identificaram-se sequências de genes de transportadores de amónio expressos nas raízes de plantas com três anos, na ausência de adubação, e analisou-se a sua diversidade e regulação em resposta à aplicação de N, após o vingamento. Para tal, colheram-se raízes finas de árvores não adubadas e isolaram-se por RT-PCR quatro sequências genéticas distintas (C3, C5, C6, C12), que apresentam forte homologia com genes de transportadores de amónio AMT1. O estudo da abundância relativa de cada uma das sequências revelou maior abundância da C3, que tem homologia com um transportador de amónio, já identificado, que se expressa em condições de deficiência de N. Na modalidade adubada, em raízes colhidas duas horas após a fertirrigação com 40 kg N/ha, este padrão alterou-se, deixando a C3 de ser a sequência mais abundante. Estes resultados evidenciam que há expressão dos transportadores de amónio logo após a fertirrigação e que estes são regulados pela adubação, com diminuição da abundância relativa do transportador que poderá estar associado a condições de deficiência de N. Os resultados obtidos podem contribuir para aperfeiçoar a tomada de decisões sobre doses a aplicar e assim melhorar a eficiência do uso da fertilização azotada.

Palavras-chave: AMT1, deficiência de azoto, *Pyrus communis*, fertirrigação.

Abstract

Evaluation of the expression of ammonium transporters in response to nitrogen fertilization in ‘Rocha’ pear grafted on ‘BA29’ quince. To clarify the role of ammonium transporters in N nutrition of ‘Rocha’ pear trees grafted on ‘BA29’ quince, genes encoding ammonium transporters (AMT1) expressed in the roots were identified under no N supply, and their diversity and regulation upon N application after fruit set was investigated. In this study, thin roots of ‘Rocha’pear/‘BA29’ quince were sampled in a plot without N fertilization and four distinct genetic sequences were isolated by RT-PCR (C3, C5, C6, C12), which showed high homology with AMT1 transporters. The study of the relative abundance of each sequence showed highest abundance of C3, homologue with one AMT1 transporter, already characterized and strongly expressed in N deficiency conditions. In the fertilized plot, in roots harvested two hours after fertigation with 40 kg N/ha, this pattern changed, and C3 was not the most abundant sequence. These results suggest that ammonium transporters are expressed immediately after fertigation and that the expression of these genes is regulated by fertilization, with reduction of the expression of the AMT1 gene that might be related to conditions of N deficiency. These results can be used to improve the decision making regarding the amounts of N fertilizers to be applied, and thus to improve the efficiency of N use.

Keywords: AMT1, nitrogen deficiency, *Pyrus communis*, fertigation.

Introdução

O azoto (N) é o principal elemento mineral necessário ao desenvolvimento dos tecidos vegetais, sendo absorvido na sua quase totalidade pelas raízes, a partir do solo. Assim, a disponibilidade de N no solo para árvores recém-plantadas é determinante para a produtividade e sustentabilidade do pomar a longo prazo. A fertilização azotada deve suprir as necessidades das árvores, tendo sempre em atenção o N disponível em cada estágio de desenvolvimento. No caso de árvores jovens, é de considerar ainda que as necessidades de N são mais baixas do que nas árvores em produção e que dotações excessivas ou inadequadas originam desequilíbrios vegetativos, além de custos económicos elevados.

A resposta das plantas à adubação azotada depende do solo e da quantidade de N disponível, mas também das necessidades da planta e das condições climáticas que favorecem a sua absorção ou a sua perda por desnitrificação e volatilização, por imobilização ou mesmo por arrastamento, com a consequente contaminação dos cursos de água subterrâneos. Novas técnicas de produção nos pomares de pereira 'Rocha' conduziram a densidades de plantação mais elevadas, ao uso da fertirrigação e à adopção de sistemas de não mobilização do solo, tornando necessária uma maior racionalização do uso de fertilizantes químicos (Neto et al., 2005).

As normas da produção integrada recomendam a aplicação máxima de 30-50 kg de N/ha por ano, para árvores em plena produção (40 t/ha) e em regime de fertirrigação, sendo esta quantidade reduzida até 20 kg N/ha por ano para árvores jovens no mesmo regime (Cavaco et al., 2006). Estas normas apontam para aplicações entre o abrolhamento e o fim da fase de multiplicação celular, quando os frutos atingem cerca de 15 mm de diâmetro, ou seja, quatro a cinco semanas após a floração (Cavaco et al., 2006).

O N é absorvido através das raízes, sobretudo na forma nítrica e amoniacal. A forma inorgânica de N, que é absorvida preferencialmente, depende da sua proporção relativa no solo e também de factores ambientais e físico-químicos do solo, como o arejamento e o pH. Quando a absorção é feita sob a forma nítrica, o N é posteriormente reduzido na planta à forma amoniacal, que serve de base à síntese de compostos orgânicos. Na ausência de fertilização, o N disponível no solo encontra-se maioritariamente na forma amoniacal proveniente da mineralização da matéria orgânica do solo (Aber & Melillo, 2001).

Em espécies herbáceas, são já conhecidos diversos genes que participam na absorção de amónio. No entanto, em fruteiras há ainda muito poucos estudos sobre o processo de absorção de amónio pelas raízes. O presente estudo debruçou-se sobre o papel dos transportadores de amónio na absorção de N em pereira 'Rocha' enxertada em marmeleiro 'BA29', tendo como objectivos a identificação de transportadores de amónio (AMT1) expressos na ausência de fertilização azotada, a caracterização do seu padrão de expressão nestas condições e a análise da alteração da sua regulação em resposta à adubação azotada. Para isso, identificaram-se sequências de genes AMT1 expressas nas raízes e caracterizou-se a sua abundância relativa em situação de ausência e na presença de fertilização azotada.

Material e Métodos

Este ensaio foi realizado na Primavera de 2005 num pomar de pereiras 'Rocha', enxertadas em marmeleiro 'BA29', com dois anos de plantação, num sistema de rega gota-a-gota com fertirrigação, localizado em Pêro Moniz, Cadaval. As amostras foram colhidas após o vingamento (48 dias após a plena floração).

A modalidade sem fertilização azotada (SN) foi mantida apenas com rega e adubação fosfo-potássica, num sistema de rega gota-a-gota com gotejadores de 3,6 L/h de débito. Na modalidade com fertilização azotada (CN), cada árvore recebeu 24 g N/ano sob a forma de nitrato de amónio (33 % N). Em cada modalidade (SN, CN) foi efectuada 1 hora de rega/adubação, 2 horas após a qual foram colhidas raízes finas (diâmetro < 2 mm) de cinco pereiras, que foram congeladas em azoto líquido e mantidas a -80°C até à extracção de RNA.

O RNA total foi extraído pelo método de Chang et al. (1993) com o tampão de extracção de CTAB suplementado com 2 % PVP (p/v) + 2 % β -ME (v/v) e a concentração de NaCl aumentada para 3 M. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria e visualizado em gel de formaldeído, para confirmar a sua integridade.

Após o tratamento com DNase I (Amersham Biosciences), 3 μ g de RNA total foram usados numa reacção de transcrição reversa com o iniciador dT_{VN} (5' TTTTTTTTTTTVN 3') e SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA assim sintetizado foi utilizado como amostra em reacções de amplificação por PCR com iniciadores específicos para genes AMT1, como anteriormente descrito (Mota et al., 2006).

Os produtos amplificados foram clonados no vector pCRII (Invitrogen), seguindo as normas do fabricante. Colónias transformadas foram seleccionadas ao acaso para purificação de DNA plasmídico por lise alcalina (Sambrook et al., 1989). O fragmento do gene AMT1 clonado foi amplificado por PCR, como descrito, e subsequentemente digerido com a enzima de restrição MboI, que permite discriminar entre genes AMT1 diferentes (Mota et al., 2006). 10 μ l de produto de PCR foram digeridos com 5 U de MboI 14 h a 37 °C e os produtos da digestão foram separados por electroforese em gel de 2 % agarose em 1 \times TAE (Sambrook et al., 1989) e visualizados sob luz ultravioleta após marcação com brometo de etídio (0,5 μ g/ml).

Resultados

Produtos transcritos de genes AMT1 com cerca de 550 bp foram isolados por RT-PCR com iniciadores específicos para genes AMT1 a partir de raízes finas de pereiras não adubadas (modalidade SN) e adubadas com 24 g N/árvore/ano (modalidade CN). Estes produtos foram clonados, visando a sua identificação.

A identificação de cada produto transcrito foi feita pelo padrão da digestão do fragmento amplificado por PCR com a enzima de restrição MboI. Esta enzima permite distinguir os diferentes AMT1s expressos nas raízes, já que a digestão do fragmento amplificado com os iniciadores AMT1, de aproximadamente 550 bp, dá origem a um fragmento ligeiramente superior a 400 bp nos transcritos do tipo C3, mantendo inalterável o fragmento no caso dos transcritos do tipo C6 e origina produtos visíveis de 250 bp nos transcritos do tipo C5 e de 250 bp + 350 bp nos transcritos do tipo C16 (Mota et al., 2006).

Em cada modalidade foram analisadas 10 colónias transformadas. Os produtos transcritos dos genes AMT1 foram amplificados por PCR a partir do DNA plasmídico purificado das colónias transformadas, obtendo-se o fragmento de aproximadamente 550bp, que foi visualizado em gel de agarose (Fig. 1a). Este produto foi de seguida digerido com MboI e o padrão da digestão foi igualmente visualizado em gel de agarose (Fig. 1b), identificando-se os genes expressos (Quadro 1).

Atendendo ao padrão de digestão verificado, pode concluir-se que, em ambas as modalidades, há expressão dos diferentes genes codificadores de transportadores do tipo

AMT1 já anteriormente identificados e designados por C3, C5 e C6. O gene associado ao transportador designado por C16 foi encontrado apenas na modalidade SN. Em cada modalidade, a abundância relativa de cada gene expresso foi avaliada pela frequência de colónias transformadas que apresentavam cada um dos transcritos. Na modalidade SN, verificou-se que o gene AMT1 mais expresso era o C3, estando presente em 70 % das colónias analisadas. Na modalidade CN, esta proporção alterou-se, representando C3 apenas 20 % das colónias analisadas. Nestas condições, assume maior abundância relativa o produto expresso C6 (60 %). Os genes expressos do tipo C5 mantêm uma abundância baixa (10 % em SN, 20 % em CN).

Discussão

Genes codificadores de transportadores de amónio do tipo AMT1 foram já identificados em diferentes plantas herbáceas (Gazzarrini et al., 1999; von Wirén et al., 2000; Becker et al., 2002; D'Apuzzo et al., 2004). Estes genes integram o sistema de transporte de alta afinidade (HATS, High Affinity System) que opera em concentrações ao nível submilimolar (D'Apuzzo et al., 2004). No entanto, há ainda muito pouca informação sobre os aspectos moleculares da absorção de N em fruteiras. Os resultados obtidos evidenciam que há expressão dos transportadores de amónio do tipo AMT1 nas raízes das pereiras 'Rocha' enxertadas em marmeleiro 'BA29' logo após a fertirrigação e que os mesmos são regulados pela adubação azotada, com diminuição da abundância relativa do transportador C3 após o fornecimento de N.

A expressão dos transportadores C3, C5, C6 e C16 2 h após a rega (com ou sem N) deverá ser analisada no âmbito do padrão de expressão descrito para este tipo de transportadores noutras espécies. O tratamento foi iniciado às 9 horas da manhã, tendo a colheita das raízes sido realizada 2 h após o seu término. A expressão dos transportadores C3, C5, C6 e C16 verificada durante o período diurno/matinal está de acordo com os padrões de regulação observados em genes AMT1 de *Arabidopsis thaliana* (Gazzarrini et al., 1999), que mostram também uma maior expressão no período diurno. No entanto, conclusões acerca da regulação de cada transportador em resposta ao fotoperíodo só poderão ser retiradas depois da análise específica da evolução do padrão da expressão destes transportadores ao longo do dia.

A baixa abundância dos transportadores C5 e C16 em ambas as modalidades concorda com o padrão observado para um transportador semelhante identificado em *Lotus japonicus* (*LjAMT1;2*). Este gene expressa-se de forma pouco abundante nas raízes desta espécie, não respondendo à deficiência de N (D'Apuzzo et al., 2004). A diminuição da abundância relativa do transportador C3 após o fornecimento de N aponta igualmente para um padrão de regulação na pereira semelhante ao descrito em *L. japonicus*, pois este transportador apresenta forte homologia com o gene *LjAMT1;1*, identificado nesta espécie e cuja expressão está associada a condições de deficiência de N (D'Apuzzo et al., 2004).

A observação da diminuição da abundância relativa de C3, 2 h após a aplicação de N, sugere que houve um reconhecimento por parte da planta da disponibilidade de $N-NH_4^+$ na rizosfera logo após o tratamento. Este conhecimento, se bem que dependente directamente da formulação de adubo disponibilizada, poderá contribuir para determinar o momento mais adequado e o período de máxima eficiência da rega no que respeita à utilização, por parte da árvore, dos fertilizantes azotados nela incluídos. Este aspecto é extremamente importante para o fruticultor, podendo futuramente vir a complementar a recomendação oficial, que preconiza o início da administração de fertilizantes através da água de rega apenas depois de aplicado um quarto a um quinto da dotação de rega e que

essa administração deverá cessar quando faltarem 10 a 20 % da água por aplicar (Cavaco et al., 2006). No entanto, é de salientar o carácter preliminar destes resultados, sendo necessário continuar os estudos, particularmente no que respeita à avaliação do padrão de expressão destes transportadores aquando do fornecimento de N isoladamente, na forma nítrica ou na forma amoniacal.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Lisboa, Portugal (FCT/FEDER/FSE) no âmbito do projecto POCI/AGR/58325/2004. M. Mota foi financiada por uma bolsa pós-doutoramento BPD14531/2003 (FCT) e C. Neto por uma bolsa de doutoramento BD10188/2002 (FCT).

Referências

- Aber, J.D. & Melillo, J.M. 2001. *Terrestrial ecosystems*. Harcourt/Academic Press. San Diego. USA, 556 p.
- ANP, 2003. *Pêra Rocha do Oeste – Passado, Presente e Futuro*, ANP 10 anos. Associação Nacional dos Produtores de Pêra Rocha, Cadaval, 155 p.
- Becker, D., Stanke, R., Fendrik, I., Frommer, W.B., Vanderleyden, J., Kaiser, W.M. & Hedrich, R. 2002. Expression of NH_4^+ transporter gene *LEAMT1;2* is induced in tomato roots upon association with N_2 -fixing bacteria. *Planta*, 215: 424-429.
- Cavaco, M.; Jordão, P. & Sousa, R. 2006. *Produção integrada da cultura de pomóideas*. DGPC, Oeiras, 167 p.
- Chang, S., Puryear, J. & Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11: 113-116.
- D'Apuzzo, E., Rogato, A., Simon-Rosin, U., El Alaoui, H., Barbulova, A., Betti, M., Dimou, M., Katinakis, P., Marquez, A., Marini, A.M., Udvardi, M.K. & Chiurazzi, M. 2004. Characterization of three functional high-affinity ammonium transporters in *Lotus japonicus* with differential regulation and spatial expression. *Plant Physiology*, 134: 1763-1774.
- Gazzarrini, S., Lejay, L., Gojon, A., Ninnemann, O., Frommer, W.B. & von Wirén, N. 1999. Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell*, 11: 937-947.
- Mota, M., Neto, C. & Oliveira, C.M. 2006. Identification of ammonium transporters in Rocha pear /BA29 combination. *Actas do XI Simposio Ibérico sobre Nutrición Mineral de las Plantas*. Pamplona/Iruñea, Julho 2006 (em impressão).
- Neto, C., Carranca, C., Varennes, A., Oliveira, C., Clemente, J. & Sobreiro, J. (2005). Nitrogen use efficiency of drip-irrigated 'Rocha' pear trees. *Acta Horticulturae* (em impressão).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York. USA.
- von Wirén, N., Lauter, F.R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W. & Frommer, W.B. 2000. Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant Journal*, 21: 167-175.

Quadros e Figuras

Quadro 1 – Abundância relativa dos genes AMT1 expressos em raízes de pereira ‘Rocha’/marmeleiro ‘BA29’ com 2 anos de plantação, nas modalidades SN e CN (% de colónias transformadas que contêm o produto transcrito Cx)

| Genes AMT1 expressos | SN | CN |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| C3 | 70 % (C1, 2, 3, 8, 9, 10, 11) | 20 % (D9, 29) |
| C5 | 10 % (C5) | 20 % (D2, 30) |
| C6 | 10 % (C6) | 60 % (D1, 5, 31, 32, 34, 35) |
| C16 | 10 % (C12) | ---- |

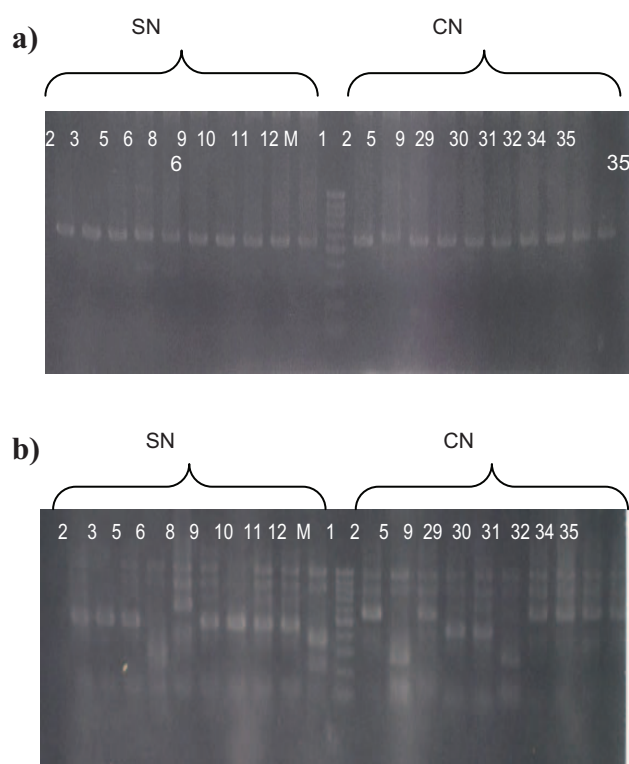


Figura 1 – Electroforese em gel de agarose dos produtos clonados amplificados por PCR com os iniciadores AMT1 a partir de DNA plasmídico das colónias transformadas C1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12 (modalidade SN) e D1, 2, 5, 9, 29, 30, 31, 32, 34 e 35 (modalidade CN) antes a) e após b) digestão com MboI. M - Marcador molecular Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas).