

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO DO NITROGÊNIO EM MUDAS DE CAFÉ ARÁBICA SUBMETIDAS A DÉFICIT HÍDRICO

Bruna Pereira de Souza¹; Hermínia Emília Prieto Martinez²; Eveline Teixeira Caixeta³; Felipe Paolinelli de Carvalho⁴; Junia Maria Clemente⁵; Juan Carlos Florez⁶; Daniela Teixeira Lelis⁷; Laércio Zambolim⁸

¹Doutoranda do programa de pós graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa-UFV, bruna_pereiradesouza@yahoo.com.

² Professora, DSc, Departamento Fitotecnia, UFV, Viçosa, hermínia@ufv.br.

³ Pesquisadora, DSc, Embrapa Café, Brasília-DF, eveline.caixeta@embrapa.br.

⁴ Pós Doutorando, DSc, UFV, Florestal, felipepaolinelli@yahoo.com.br.

⁵ Pós Doutoranda, DSc, UFV, Rio Paranaíba, junia.clemente@gmail.com.

⁶ Doutorando do programa de Genética e Melhoramento Vegetal, UFV, juancarlos.florez2@gmail.com

⁷ Bolsista do Consórcio Embrapa Café, Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro, UFV, danitlelis@yahoo.com.br

⁸ Professor, PhD, Departamento Fitopatologia, UFV, Viçosa, zambolim@ufv.br.

RESUMO: O estresse hídrico afeta o metabolismo celular vegetal, incluindo a assimilação do nitrogênio, com consequências drásticas no crescimento e desenvolvimento da planta. Dessa forma, nesse trabalho foi avaliado a influência do déficit hídrico na transcrição diferencial de genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio. O experimento foi montado em um esquema fatorial 2 x 2, compostos de 2 cultivares de café (Catuaí Amarelo IAC62 e Mundo Novo IAC379-19) e dois tratamentos (sem déficit hídrico e com déficit hídrico), no delineamento em blocos casualizados com três repetições, onde cada parcela era constituída por duas plantas. Folhas foram coletadas às 8 e 96 h após aplicação dos tratamentos e tiveram o RNA extraído. Avaliou-se o perfil transcricional dos genes NIA2 (*Nitrate Reductase [NADH] 2*), GLN1.3 (*Glutamine Synthetase Cytosolic Isozyme 1.3*) e GLT1 (*Glutamate Synthase 1 [NADH]*). Esses genes foram identificados em outras espécies de plantas como sendo envolvidos na assimilação do nitrogênio. Observou-se que os três genes estudados aumentaram rapidamente a sua expressão em plantas submetidas ao déficit hídrico. A cultivar Catuaí Amarelo apresentou maior indução do gene NIA2, enquanto que a cultivar Mundo Novo apresentou maior transcrição diferencial dos genes GLN1.3 e GLT1. A maior indução dos genes pode indicar medida adaptativa nessas condições de estresse. Esses dados sugerem que em condições de déficit hídrico o ciclo de assimilação do nitrogênio na cultura do café é rapidamente remodelado.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, qPCR, estresse hídrico, assimilação do nitrogênio.

EXPRESSION OF GENES RELATED TO NITROGEN METABOLISM IN ARABIC COFFEE SEEDLING UNDER WATER DEFICIT

ABSTRACT: Water stress affects the plant cellular metabolism, including the assimilation of nitrogen, with leads to drastic consequences on growth and development of plants. Thus, the influence of water stress on differential transcription of genes related to nitrogen metabolism was evaluated. The experiment was realized in a 2 x 2 factorial scheme, being two coffee cultivars (Catuaí Amarelo IAC62 and Mundo Novo IAC379-19) and two treatments (well-watered and hydric stress), in randomized blocks design with three replications. Each experimental plots was represent by two plants. Leaves were collected at 8 and 96 hours after treatments and the RNA was extracted. The transcriptional profile of genes NIA2 (*Nitrate Reductase [NADH]2*), GLN1.3 (*Glutamine Synthetase Cytosolic Isozyme 1.3*) and GLT1 (*Glutamate Synthase 1[NADH]*) were evaluated. These genes were identified in others species of plants as gene linked to nitrogen assimilation. The genes increased the expression in coffee under water stress. The Catuaí Amarelo showed higher induction of NIA2 gene, while Mundo Novo cultivar obtained higher differential transcription of GLN1.3 and GLT1 genes. The higher induction of genes can indicated an adaptation on stress conditions. These data suggest that in water stress conditions the nitrogen assimilation cycle on coffee is quickly activated.

KEYWORDS: *Coffea arabica*, qPCR, water stress, nitrogen assimilation.

INTRODUÇÃO

O cafeeiro está sujeito a diferentes estresses ambientais e o déficit hídrico é considerado um dos mais importantes por afetar o crescimento, o desenvolvimento e a produtividade dessa cultura (DaMatta & Ramalho, 2006). Em condição de limitação hídrica, a planta aciona mecanismos de sobrevivência. A primeira resposta é a redução da abertura estomática como forma de restrição à perda de água excessiva e, concomitantemente, redução na assimilação de carbono devido ao aumento da resistência a entrada do CO₂ nos estômatos (DaMatta & Ramalho, 2006; DaMatta, 2004). Nesse processo, o

metabolismo do nitrogênio também é afetado, uma vez que os ciclos de assimilação do carbono e nitrogênio são interligados e dependentes.

O nitrogênio, além de ser um nutriente essencial para as plantas, é constituinte de proteínas, ácidos nucleicos e muitos componentes celulares importantes, como clorofila e vários hormônios. Esse nutriente serve também como uma molécula de sinalização que rapidamente desencadeia mudanças na expressão gênica, metabolismo e crescimento em plantas (Alboresi et al., 2005), induz a expansão foliar (Walch-Liu et al., 2000) e regula o desenvolvimento de raízes laterais.

A eficiência do uso do nitrogênio pela planta exige uma profunda compreensão dos mecanismos que regulam a assimilação desse nutriente, incluindo sua absorção, seu transporte dentro da planta e o metabolismo do N. Esse mecanismo tem sido estudado em plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*, e algumas enzimas e suas funções na assimilação do nitrogênio têm sido elucidadas.

A enzima *Nitrato Redutase* (NR) catalisa o primeiro passo de assimilação do nitrato. A expressão de genes NR é rapidamente induzido por nitrato em diversas plantas. A NIA2 é um dos dois genes que codificam para a redutase do nitrato em plantas, e é predominantemente expresso em folhas verdes. O gene NIA2 é responsável por 90% de toda a atividade de NR da planta enquanto NIA1, um gene constitutivo, responde pela atividade residual (10 %) (Price et al., 2004; Gojon et al., 2009).

A proteína *Glutamina Sintetase* (GS) está envolvida no processo de assimilação primária de amônio em plantas superiores. Ela catalisa a reação do glutamato, oriundo do ciclo de Calvin, e NH_4^+ em glutamina (Epstein & Bloom, 2006). A GS1 (GLN1.3), a principal forma encontrada nas raízes das plantas, está localizada no citosol e a GS2 encontrada nos plastos/cloroplastos.

A *Glutamina-2-oxoglutarato Aminotransferase* (GLT1) é uma enzima dependente de NADH (NADH-GOGAT). O NADH-GOGAT GLT1 mRNA é expresso em níveis mais elevados em raízes. As enzimas GS/GOGAT desempenham um papel fundamental no metabolismo das plantas, pois além de representarem a principal via de entrada de nitrogênio orgânico novo, proveniente do ambiente (assimilação primária), também participam da reciclagem do NH_4^+ gerado em diversos processos metabólicos tais como a fotorrespiração, o "turn over" de proteínas, o catabolismo de aminoácidos carreadores de N, reações de biossíntese envolvendo aminoácidos e a biossíntese de lignina - conversão de fenilalanina em cianamato catalisada pela enzima fenilalanina amônia liase (Irland & Lea, 1999).

Tendo em vista o melhor entendimento fisiológico da deficiência hídrica, objetivou-se com o presente estudo avaliar a transcrição diferencial de genes relacionados a assimilação de nitrogênio durante o período de déficit hídrico em cultivares de café.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa. Plantas das cultivares Catuaí Amarelo IAC62 e Mundo Novo IAC379-19 foram aclimatadas por quatro semanas em caixas contendo 30 L de solução nutritiva. A solução nutritiva foi formulada com as concentrações: 5,0 mmol L⁻¹ NO₃⁻, 0,5 mmol L⁻¹ P, 3,25 mmol L⁻¹ K, 1,0 mmol L⁻¹ Mg, 2,25 mmol L⁻¹ Ca, 2,125 mmol L⁻¹ S, 23 µmol L⁻¹ B, 0,3 µmol L⁻¹ Cu, 80 µmol L⁻¹ Fe, 12 µmol L⁻¹ Mn, 0,3 µmol L⁻¹ Mo e 1,0 µmol L⁻¹ Zn. A solução inicial foi de ½ força, com aeração constante e pH mantido em torno de 5,7 ± 0,3. Após a aclimação as plantas foram mantidas em caixas contendo 30 L de solução nutritiva e 15 plantas por caixa, por um período de 240 dias. Foi mantida aeração constante nas caixas e a solução renovada a cada vinte dias. Plantas com aproximadamente 28 cm de altura, onze pares de folhas e emitindo ramos plagiotrópicos foram transferidas para uma câmara de crescimento com temperatura controlada (23-24°C), luminosidade de 200 µmol m⁻² s⁻¹, unidade relativa entre 56-58 % e fotoperíodo de 12h/12h (luz/escuro). As plantas foram transferidas para vasos contendo 2,5 L de solução nutritiva. Nos primeiros 15 dias as plantas foram cultivadas em solução nutritiva, sem aplicação dos tratamentos para se adaptarem. Aos 15 dias, iniciou-se a imposição da deficiência hídrica em sistema hidropônico. Um terço dos vasos receberam polietileno glicol (PEG 8000) para imposição da deficiência hídrica, a dose aplicada foi de 355 g L⁻¹ (Villela & Beckert, 2001) aplicada de forma gradativa durante quatro dias (96 h), obtendo-se ao final da aplicação um potencial hídrico de -1,5 MPa. Após as 96 h, a solução nutritiva foi trocada, os vasos com PEG 8000, receberam novamente solução nutritiva com a dose de PEG 8000 necessária para se obter potencial hídrico na solução nutritiva de -1,5 MPa.

Este experimento foi montado em um esquema em fatorial 2 x 2, compostos de 2 cultivares de café (Catuaí Amarelo IAC62 e Mundo Novo IAC379-19) e dois tratamentos (sem déficit hídrico e com déficit hídrico (-1,5 MPa)) no delineamento em blocos casualizados com três repetições, onde cada parcela era constituída por duas plantas. O período experimental foi de 96 h, com coletas do sétimo e oitavo par de folhas completamente expandida as 8 e 96 h após aplicação dos tratamentos. As folhas coletadas foram imersas imediatamente em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C para posterior análise.

Folhas das plantas de café previamente congeladas foram maceradas em N₂ líquido e destinadas à extração de RNA utilizando-se Concert® (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante. Foram extraído RNA de três plantas de cada cultivar. O RNA total foi quantificado com o auxílio do Qubit RNA BR (Life Technologies) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com 1 µL de brometo de etídio. Cada amostra de RNA foi

tratada com DNase I (Promega), seguindo recomendações do fabricante (1 µg para qRT-PCR). Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit Improm II (Promega), com base nas instruções do fabricante.

As sequências do genoma de arábido, tomate e uva, relacionadas aos genes envolvidos com a assimilação do nitrato, foram obtidas do NCBI (www.ncbi.gov) e utilizadas para minerar sequências relacionadas de café no Projeto Brasileiro do Genoma Café. Os genes usados na mineração foram: NIA2 (*Nitrate Reductase [NADH] 2* – obtida de *Arabidopsis thaliana*), GLN1.3 (*Glutamine Synthetase Cytosolic Isozyme 1.3* - de *Solanum lycopersicum*), GLT1 (*Glutamate Synthase 1 [NADH]* - de *Vitis vinifera*). *Primers* que amplificam as sequências mineradas foram desenhado usando o programa *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e *Primer 3*. A validação dos *primers* foi realizada pela curva padrão relativa utilizando amostra do cDNA sintetizado diluída com os fatores de diluição: 3, 9, 81, 243 e 729, usando três repetições para cada diluição. A especificidade das reações de amplificação foi determinada pela Tm dos produtos da reação de amplificação. Foram considerados válidos os *primers* de equação linear com R² >98 %, coeficiente de variação <10 %, eficiência de amplificação entre 96 e 110 % e Sloop de aproximadamente -3.

A análise de expressão relativa foi realizada em equipamento Step-One Plus (Applied Biosystems, US), utilizando triplicatas. A análise de dados foi feita utilizando o *software* Step-One Plus versão 2.0 (Applied Biosystems, US). Os valores do Ct (*threshold cycle*) das réplicas foram calculados pelo método de quantificação relativa dos níveis de cópia de amplificação. Cada reação foi composta de 0,2 µmol⁻¹ de cada *primer*, 0,1 µL de dNTPs 5 mmol L⁻¹, 2 µL de tampão PCR 10X, 1,2 µL de MgCl₂ 50 µmol L⁻¹, 2 µL de SYBR green (100X), 0,4 µL de ROX, 0,05 µL de Platinum Taq DNA pol 5U/µL (Invitrogen), 0,4 µL de cDNA e completando o volume para 10 µL com água. O programa de PCR foi de 90 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 seg, 58 °C por 1 min. A curva de dissociação foi determinada pelas temperaturas de 60 °C elevando em 0,2 °C a cada 20 s até atingir 95 °C. Foram avaliados os RNAs coletados a 8 e 96 horas após aplicação dos tratamentos, e na análise dos dados, considerou-se as plantas bem supridas com N e ausência de déficit hídrico como controle comparativo da expressão relativa do gene. Para normalizar a expressão relativa dos genes foi utilizado *primer* do gene constitutivo GAPDH (*Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*), por apresentar menor desvio padrão entre os tratamentos.

Na determinação das diferenças estatística do padrão de expressão dos genes entre as cultivares foi utilizado análise de variância com teste F a 5 % de probabilidade, sendo comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De maneira geral, a expressão relativa dos três genes estudados aumentou em resposta ao déficit hídrico em relação ao controle, para as duas cultivares (Figura 1, 2 e 3). Esses dados indicam que em condições de déficit hídrico o ciclo de assimilação do nitrogênio na cultura do café é rapidamente remodelado.

A expressão relativa do gene NIA2 foi maior na cultivar Catuaí Amarelo nos dois tempos estudados (Figura 1). Esse gene é responsável pela produção da nitrato redutase, importante enzima do ciclo do nitrogênio. Este é um gene estrutural e o seu nível de transcrição é controlado pela luz. A atividade desta enzima depende de NADH, sendo que o RNA mensageiro (mRNA) do gene NIA2 em arábido tem a sua transcrição induzida pelo nitrato (Konishi; Yanagisawa, 2011), mas não é um pré-requisito absoluto para a expressão do gene (Mazid et al., 2012). Desta forma, o déficit hídrico aumentou a expressão do gene NIA e, conseqüentemente, também aumentou a abundância do seu mRNA no cafeeiro. A maior indução do gene NIA2 na cultivar Catuaí Amarelo, 8 e 96 h após aplicação do tratamento, pode indicar medida adaptativa, e nessas condições de estresse haveria aumento da redução do nitrato em folhas.

A expressão de GLN1.3 nas plantas de café foi rapidamente induzido pelo déficit hídrico, pois 8 h após aplicação dos tratamentos os transcritos aumentaram cerca de 2,5 vezes, para as duas cultivares. Observou-se um maior aumento da expressão do gene na cultivar Mundo novo às 96 h após a imposição do déficit hídrico, sendo uma diferença significativa em relação a cultivar Catuaí.

O gene GLN1.3 codifica para a enzima GS (*Glutamina Sintase*), que é responsável pela assimilação do NH₄⁺ e está relacionada à remobilização de nitrogênio. Estudos realizados em diferentes culturas mostraram que variedades mais eficientes nutricionalmente na utilização de nitrogênio, em relação a sua absorção e utilização, apresentam maiores atividades de GS (Unno et al., 2006; Tabuchi et al., 2007). O efeito na absorção é explicado, de forma indireta, visto que a diminuição na concentração de glutamina aumenta a síntese de transportadores de alta afinidade, na raiz, modulando assim essa absorção (Sivasankar et al., 1997). Já a eficiência de utilização está relacionada com a maior capacidade de assimilação do N-NH₄⁺, evitando possíveis intoxicações, e a retranslocação de N na planta, aumentando a eficiência de utilização do N (Hirel e Lea, 2001).

Os aumentos observados na expressão de GLN1.3 nas cultivares estudadas, indicam uma estratégia das plantas em aumentar os transcritos e assim, possivelmente, aumentar a atividade da GS e a eficiência de utilização do N em condições de déficit hídrico, já que esta condição leva a menor disponibilidade de nitrogênio para a planta. A falta de água pode levar a deficiência de nutrientes, em parte porque a água proporciona o meio para a absorção da maioria dos elementos minerais pelas raízes, como é o caso no nitrogênio que entra em contato com as raízes da planta por fluxo em massa (DaMatta et al., 2002).

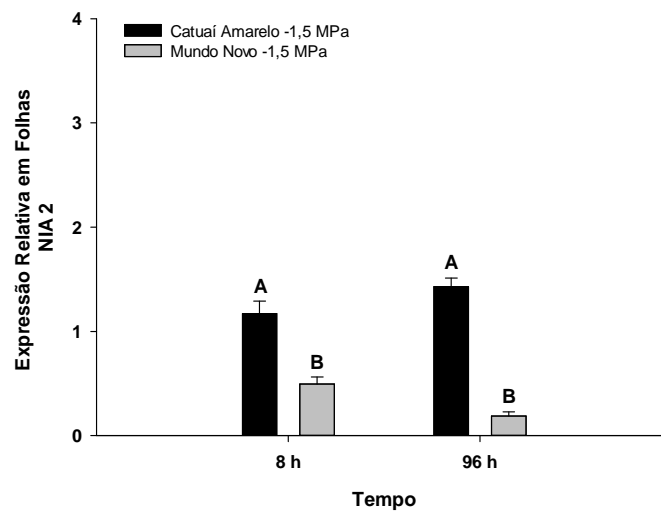


Figura 1. Expressão relativa do gene NIA2 em mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo cultivadas em solução nutritiva, submetidas ao seguinte tratamento: -1,5 MPa (potencial hídrico na solução nutritiva ($|\Psi_w|$ -1,5 MPa) em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação dos tratamentos. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

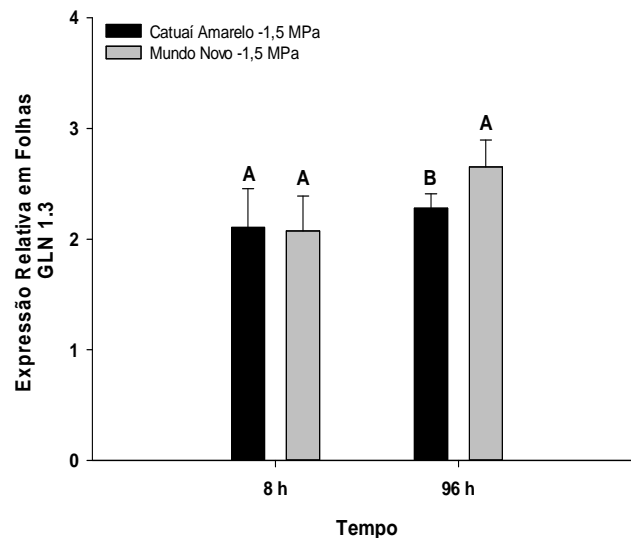


Figura 2. Expressão relativa do gene GLN1.3 em mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo cultivadas em solução nutritiva, submetidas ao seguinte tratamento: -1,5 MPa (potencial hídrico na solução nutritiva ($|\Psi_w|$ -1,5 MPa) em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação dos tratamentos. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Na análise do terceiro gene, o GLT1, considerando as duas cultivares, verificou-se um aumento da expressão com o tempo. A cultivar Mundo Novo apresentou maior expressão em condição de déficit hídrico, quando comparada com a cultivar Catuaí. O gene GLT1 codifica para a enzima *Glutamato Sintase* (GOGAT) que catalisa a conversão, dependente de poder redutor, de glutamina e 2-oxoglutarato em duas moléculas de glutamato. A isoforma da GOGAT codificada por este gene, dependente de NADH. Em arábida essa enzima é encontrada principalmente em tecidos não fotossintéticos como sementes e raízes (Irland & Lea, 1999). Em cafeeiro foi encontrado o mRNA do gene GLT1 que codifica para esta enzima nas folhas, o que sugere a presença desta enzima em tecidos fotossintetizantes na cultura do café. A outra isoforma da GOGAT é dependente de ferredoxina e sua expressão é baixa em tecidos radiculares e

mais abundante em folhas. A atividade de NADH-GOGAT é 2-25 vezes mais baixa do que a de Fd-GOGAT (Suzuki et al., 1994). Estudos genéticos de gls (mutantes para o gene Fd-GOGAT) em *Arabidopsis* mostraram que NADH-GOGAT foi incapaz de substituir a deficiência de Fd-GOGAT, sugerindo que NADH-GOGAT realiza função metabólica distinta. Foi proposta função de NADH-GOGAT na exportação de glutamina de tecidos e raízes senescentes para o floema. Também foi sugerido que NADH-GOGAT tem papel importante na assimilação de nitrogênio primário no sistema radicular da planta (Ishiyama et al., 1998). O aumento na expressão desse gene nas cultivares Catuaí Amarelo e Mundo Novo em condições de déficit hídrico pode indicar uma possível estratégia das plantas de café para exportar glutamina das folhas completamente expandidas para outras partes da planta.

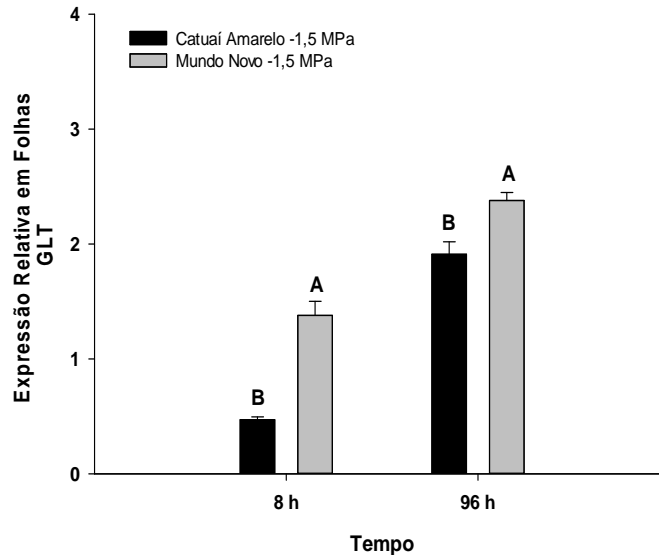


Figura 3. Expressão relativa do gene GLT em mudas de café das cultivares Catuaí Vermelho e Mundo Novo cultivadas em solução nutritiva, submetidas ao seguinte tratamento: -1,5 MPa (potencial hídrico na solução nutritiva ($|\Psi_w|$ -1,5 MPa) em diferentes tempos: 8 e 96 após aplicação dos tratamentos. Barras de erro indicam o erro padrão da média. Barras com letras maiúsculas distintas indicam diferença entre as cultivares dentro do mesmo tempo, pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Apesar do considerável conhecimento científico gerado na compreensão dos processos de absorção e transporte de nitrogênio e sua regulação em plantas modelo, pouco se conhece sobre os mecanismos fisiológicos e moleculares desse processos em plantas cultivadas (Hirel et al., 2007; Xu et al., 2012). No presente trabalho, a expressão de alguns genes encontrados em outras espécies como sendo relacionados a assimilação de nitrogênio foram analisados em cafeeiros, sendo comprovada a resposta desses genes a condições de déficit hídrico.

CONCLUSÕES

O déficit hídrico induziu rapidamente a transcrição diferencial dos três genes estudados, indicando que em condições de déficit hídrico o ciclo de assimilação do nitrogênio na cultura do café é rapidamente remodelado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBORESI, A.; GESTIN, C.; LEYDECKER, M.T.; BEDU, M.; MEYER, C.; TRUONG, H.N. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* 28: 500–512, 2005.
- CRUZ, F.; KALAOUN, S.; NOBILE, P.; COLOMBO, C.; ALMEIDA, J.; BARROS, L.M.G.; ROMANO, GROSSI-DE-SÁ, M.F.; VASLIN, M.; FERREIRA, M.A. Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding* 23:607–616, 2009.
- DaMATTA F.M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16:1-6, 2004.
- DaMATTA, F.M.; RAMALHO, J.D.C. Drought and temperature stress on coffee physiology and production. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18(1):55-81, 2006.
- DaMATTA, F.M.; LOOS, R.A.; SILVA, E.A.; LOUREIRO, M.E. Limitations to photosynthesis in *Coffea canephora* as a result of nitrogen and water availability. *Journal of Plant Physiology* 159: 975-981, 2002.

- EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. Londrina: Editora Planta, 403p, 2006.
- GOJON, A.; NACRY, P.; DAVIDIAN, J.C. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12:328-338, 2009.
- HIREL, B.; GOUIS, J.; NEY, B.; GALLAIS, A. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58:2369-2387, 2007.
- IRELAND, R.J.; LEA, P.J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism in Plant. *Amino Acids, Biochemistry and Biotechnology*. ed Singh BK (Marcel Dekker, New York), pp 49–109, 1999.
- ISHIYAMA, K.; HAYAKAWA, T.; YAMAYA, T. Expression of NADH-dependent glutamate synthase protein in the epidermis and exodermis of rice roots in response to the supply of ammonium ions. *Planta* 204: 288–294, 1998.
- KONISHI, M.; YANAGISAWA, S. The regulatory region controlling the nitrate responsive expression of a nitrate reductase gene, NIA1, in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 52(5): 824-836, 2011.
- LIAN, X.; XING, Y.; XU, H.Y.C.; LI, X.; ZHANG, Q. QTLs for low nitrogen tolerance at seedling stage identified using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. *Theoretical and Applied Genetics* 112:85–96, 2005.
- MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of nitrate reductase in nitrogen fixation under photosynthetic regulation. *World Journal of Pharmaceutical Research* 1(3): 386-414, 2012.
- PRICE, J.; LAXMI, A.; MARTIN, S.K.; JANG, J.C. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2128-2150, 2004.
- SIVASANKAR, S.; OAKS, A. Nitrate assimilation in higher plants: the effect of metabolites and light. *Plant Physiology and Biochemistry* 34: 609-620, 1996.
- SUZUKI, A.; VERGNET, C.; MOROT-GAUDRY, J.-F.; ZEHNACKER, C.; GROSCLAUDE, J. Immunological characterization of ferredoxin and methyl viologen interaction domains of glutamate synthase using monoclonal antibodies. *Plant Physiology and Biochemistry* 32: 619, 1994.
- TABUCHI, M.; ABIKO, T.; YAMAYA, T. Assimilation of ammonium-ions and re-utilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 8: 2319-2327, 2007.
- UNNO, H.; UCHIDA, T.; SUGAWARA, H.; KURISU, G.; SUGIYAMA, T.; YAMAYA, T.; SAKAKIBARA, H.; HASE, T.; KUSUNOKI, M. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *Journal of Biological Chemistry* 281:29287-29296, 2006
- VILLELA, F.A.; BECKERT, O.P. Potencial osmótico de soluções aquosas de polietileno 482 glicol 8000. *Revista Brasileira de Sementes* 23:267-275, 2001.
- WALCH-LIU, P.; NEUMANN, G.; BANGERTH, F.; ENGELS, C. Rapid effects of nitrogen form on leaf morphogenesis in tobacco. *Journal of Experimental Botany* 51: 227-237, 2000.